

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**ALTERACIONES VASCULARES PULMONARES E
HIPERTENSIÓN PULMONAR EN MODELOS DE DIABETES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier Moral Sanz

Bajo la dirección de los doctores

Francisco Pérez Vizcaíno
Ángel Cogolludo Torralba

Madrid, 2012

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología



***Alteraciones vasculares pulmonares e
hipertensión pulmonar en modelos
experimentales de diabetes.***

TESIS DOCTORAL

JAVIER MORAL SANZ

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de farmacología

Alteraciones vasculares pulmonares e hipertensión pulmonar en modelos de diabetes.

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por:

JAVIER MORAL SANZ

Bajo la dirección de:

Dr. FRANCISCO PÉREZ VIZCAÍNO

Dr. ÁNGEL COGOLLUDO TORRALBA.

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha sido llevado a cabo en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y ha sido financiado por:

- La Universidad Complutense de Madrid a través de una *Beca de Iniciación a la Actividad Investigadora* concedida en el 2007.
- El Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) a través de un *Contrato de Investigador Junior* y de las *Ayudas para la Movilidad CIBERES*.
- El Ministerio de Educación a través de una beca predoctoral de *Formación de Profesorado Universitario (FPU)*, concedida en el año 2008.
- El Ministerio de Ciencia e Innovación por medio de los proyectos SAF2008-03948 y SAF2010-22066-C02-02, concedidos al Dr. Pérez Vizcaíno y al Dr. Cogolludo, respectivamente.

A mis Padres

*“...y depende del cristal con el que miras,
todo es horrible o terriblemente bello...”*

Enrique Ortiz de Landázuri Izardui

AGRADECIMIENTOS

Tras casi cinco años de camino es el momento de parar, darse la vuelta y, poniendo los brazos en jarra, mirar hacia atrás. Es en ese momento cuando uno se da cuenta de que el camino se hace al andar, pero que no habría camino alguno sin todos y cada uno de aquellos que te han acompañado durante el trayecto.

Son muchos a los que debo agradecer, pero sin duda empezaré por mi familia. Gracias a mis padres que me lo han dado todo y me han enseñado todo con amor incondicional. A mi hermano mayor Juanjo, un modelo a seguir en todos los aspectos, y mi hermano pequeño Jaime del que he aprendido más de lo que yo haya podido enseñarle. A mis abuelos Pilar, Juan Ángel, Pepita y Bienvenido a los que quiero como a unos padres. Gracias a las recientes incorporaciones a mi familia, Silvia y Rodri, por traer un soplo de vida, de pañales, de sonrisas desdentadas y de una inagotable energía.

Este trabajo no sería más que un montón de hojas en blanco sin mis Directores de Tesis y compañeros, cuyo valor humano está al mismo nivel que su excelente calidad científica. Gracias a Paco y a Ángel por acogerme en su grupo y darme esta oportunidad sin conocerme de nada, por su tiempo, por su dedicación, por su conocimiento compartido, por su paciencia con mi mala costumbre de apurar los plazos de entrega, por revisar y corregir meticulosamente esta Tesis y por su apoyo durante todos estos años. Gracias a mis compañeros de laboratorio Laura, Giovanna, Carmencita, Quique, Bianquil y Dani, por sus consejos, por compartir los buenos y los malos momentos del trabajo de laboratorio, por los cafés mañaneros, por las conversaciones durante los momentos de disección, por esos estupendos seminarios-degustación, por hacer que el tiempo que hemos trabajado juntos en el laboratorio pasase volando, por eso y por otras tantas cosas más que no quedarán escritas. Este libro les pertenece.

Gracias a todos aquellos que han colaborado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral y en la elaboración de los artículos asociados a ella. En especial gracias al Dr. López-López y a los miembros de su laboratorio, a la Dra. Prieto, a la Dra. Fernandez-Segoviano y al Dr. Villamor.

Gracias a todos aquellos con los que he compartido buenos momentos dentro y/o fuera del laboratorio. Gracias al grupo de Carmen, Tere, Cristina, Álvaro, Ángela, Alicia. Gracias a Miren por arrancarme siempre una carcajada eligiendo los gestos y las palabras adecuadas en cada momento. Gracias a Anabel, Ángela, Miguelito, Robin, Pilar, Lucía, Leonie, Andrea y toda la gente de Graz y a Alison y todos los de Manchester.

Gracias al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid por acogerme como a uno más. A los Directores del Departamento durante mi tiempo aquí, el Dr. Lizasoain y la Dra. Colado. Gracias a María Elena por su excelente labor a cargo de la secretaría. Gracias a Fernando, Manolo, María Luisa, Raquel, Marisa, Pilar y a todos los compañeros predoctorales, postdoctorales y técnicos de los otros laboratorios del departamento.

A ellos y todos los que vaya a recordar llevándome la mano a la cabeza una vez que este libro esté impreso, gracias.

ÍNDICE

ABSTRAC.	21
ABREVIATURAS.	29
INTRODUCCIÓN.	33
1. Fisiología de la circulación pulmonar.	35
1.1. La circulación pulmonar.	
1.2. Las arterias pulmonares.	
1.3. La presión pulmonar.	
1.4. Regulación de la circulación pulmonar.	
2. La hipertensión pulmonar.	41
2.1. Clínica y clasificación.	
2.2. Epidemiología y supervivencia.	
2.3. Fisiopatología de la hipertensión pulmonar.	
2.4. Tratamiento.	
3. Contribución de la disfunción endotelial a la patogénesis de la hipertensión pulmonar.	51
3.1. El endotelio.	
3.2. La vía del óxido nítrico.	
3.3. La endotelina.	
3.4. Los prostanoideos.	
3.4.1. La ciclooxigenasa.	
3.4.2. La prostaciclina.	
3.4.3. Tromboxano A ₂ .	
3.5. Estrés oxidativo.	
3.5.1. Fuentes de estrés oxidativo.	
3.5.2. Enzimas antioxidantes.	
4. Contribución de la serotonina a la patogénesis de la hipertensión pulmonar.	60
4.1. Aspectos generales de la serotonina.	
4.2. Evidencias de la relación entre la serotonina y la hipertensión pulmonar.	
5. Los canales K_v y la hipertensión pulmonar.	62
5.1. Conceptos generales de los canales K _v .	

5.2 Implicación de los canales K _v en la patología de la hipertensión pulmonar.	
6. La relación de las proteínas morfogenéticas óseas con la hipertensión pulmonar.	66
6.1. Señalización intracelular de BMP.	
6.2. Implicación de BMPR en la patología de la hipertensión pulmonar.	
7. La hipoxia y la hipertensión pulmonar.	70
7.1. La vasoconstricción pulmonar hipóxica.	
7.2. Contribución de la hipoxia a la patogénesis de la hipertensión pulmonar.	
8. La diabetes mellitus.	78
8.1. Diabetes mellitus tipo 1.	
8.2. Diabetes mellitus tipo 2.	
8.3. Diabetes mellitus y la patología cardiovascular sistémica.	
8.4. Mecanismos moleculares del daño vascular en la patología diabética.	
8.4.1. La hiperglucemia.	
8.4.2. La resistencia a la insulina.	
8.5. La diabetes mellitus y la patología pulmonar.	
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	83
MATERIAL Y MÉTODOS.	89
1. Animales de experimentación y modelos.	91
1.1. Modelo de diabetes tipo 1.	
1.2. Modelo de resistencia a la insulina.	
1.3. Modelos de diabetes tipo 1 e hipoxia moderada.	
2. Medida de la presión arterial pulmonar, sistémica y ventricular derecha.	93
3. Tejidos.	94
4. Histología	94
5. Detección de superóxido.	95

6. Inmunohistoquímica.	96
6.1. Detección de p47 ^{phox} en las arterias pulmonares.	
6.2. Detección de CD68 en pulmón.	
7. Análisis de la expresión génica.	97
8. Análisis de la expresión proteica.	99
9. Reactividad vascular.	101
10. Estudios electrofisiológicos.	102
10.1. Aislamiento de células de músculo liso.	
10.2. Registros de las corrientes.	
11. Medida de la actividad mieloperoxidasa.	104
12. Fármacos empleados.	105
13. Análisis estadístico.	106
RESULTADOS.	109
1. Estudio de la contractilidad de arterias pulmonares, función endotelial y marcadores de hipertensión pulmonar en el modelo de diabetes tipo 1.	111
1.1. Estudio de la contractilidad de arterias pulmonares en el modelo de diabetes tipo 1.	112
1.2. Medida de la función endotelial en el modelo de diabetes tipo 1.	113
1.2.1. Respuesta a acetilcolina.	
1.2.2. Contribución de la vía del óxido nítrico.	
1.2.3. Participación del anión superóxido.	
1.2.4. Papel de la enzima NADPH oxidasa.	
1.3. Marcadores de hipertensión pulmonar en el modelo de diabetes tipo 1.	118
1.3.1 Efectos de la diabetes en la presión arterial sistémica (PAS), presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) e índice de Fulton.	
1.3.2 Remodelado vascular del pulmón.	
1.3.3 Expresión pulmonar de BMPR2.	
1.3.4 Análisis electrofisiológico y expresión de Kv1.5.	

- 1.3.5. Caracterización de la respuesta a 5-HT.
 - 1.3.5.1 Contracción de las AP a 5-HT.
 - 1.3.5.2. Estudio del papel de los receptores 5-HT_{2A} en la contracción a 5-HT.
 - 1.3.5.3. Papel de la ciclooxygenasa y del anión superóxido en la respuesta a 5-HT en diabetes.
 - 1.3.5.4. Efectos sobre la contracción a 5-HT del tromboxano A₂ y superóxido en condiciones control.

2. Estudio de la contractilidad de arterias pulmonares, función endotelial y marcadores de hipertensión pulmonar en el modelo de resistencia a la insulina. 129

- 2.1. Estudio de la contractilidad de arterias pulmonares en el modelo de resistencia a la insulina. 130
 - 2.1.1. Contractilidad de las arterias pulmonares de conductancia.
 - 2.1.2. Contractilidad de las arterias pulmonares de resistencia.
- 2.2. Medida de la función endotelial en el modelo de resistencia a la insulina. 134
 - 2.2.1. Respuesta a acetilcolina.
 - 2.2.2. Contribución de la vía del óxido nítrico.
- 2.3. Marcadores de hipertensión pulmonar en el modelo de resistencia a la insulina. 137
 - 2.3.1. Análisis del grosor de las paredes cardíacas.
 - 2.3.2. Expresión de BMPR2.
 - 2.3.3. Análisis electrofisiológico y expresión de K_V1.5.
 - 2.3.4. Estudio de la respuesta de las arterias pulmonares a 5-HT.
 - 2.3.4.1. Estudio del papel de los receptores 5-HT_{2A} en la contracción a 5-HT.
 - 2.3.4.2. Papel de la NOS inducible.

3. Estudio de las alteraciones generadas por la diabetes tipo 1, la hipoxia moderada y su combinación.	143
3.1. Función endotelial.	145
3.2. Corrientes K_v .	146
3.3. Expresión de BMPR2.	148
3.4. Análisis histológicos.	148
3.4.1 Remodelado vascular del pulmón	
3.4.2. Análisis de la naturaleza del infiltrado pulmonar en ratas diabéticas.	
3.5. Remodelado cardiaco.	152
3.6. Presión ventricular derecha, presión arterial pulmonar y frecuencia cardiaca.	153
DISCUSIÓN.	155
1. La función endotelial de las arterias pulmonares en la diabetes tipo 1.	157
2. La función endotelial de las arterias pulmonares en la resistencia a la insulina.	160
3. Hiperrespuesta a 5-HT de las arterias pulmonares en la diabetes tipo 1.	161
4. Respuesta a vasocostrictores de las arterias pulmonares en la resistencia a insulina.	165
5. Marcadores de hipertensión pulmonar en la diabetes tipo 1: remodelado, K_v y BMPR2.	167
6. Marcadores de hipertensión pulmonar en la resistencia a la insulina: remodelado, K_v y BMPR2.	170
7. Diabetes tipo 1 e hipoxia moderada.	171
8. Discusión general y futuras investigaciones.	175
CONCLUSIONES.	179
BIBLIOGRAFÍA.	183
ANEXO	217

ABSTRACT

ABSTRACT

Background

Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease of poor prognosis defined by an increased mean pulmonary artery pressure (mPAP) over 25 mmHg at rest. Additionally, the sustained elevation of the PAP leads to right ventricle hypertrophy. In its most aggressive forms like pulmonary arterial hypertension (PAH) it leads to heart failure and death in approximately 70% of patients 5 years after diagnosis (Laurenço *et al.*, 2011). PAH is characterized by an increased pulmonary vascular resistance as a consequence of vasoconstriction of pulmonary arteries (PA), vascular smooth muscle cell and endothelial cell proliferation leading to PA remodelling and/or thrombosis *in situ*. Furthermore, PAH has a complex physiopathology unlikely to be explained by a single factor or gene mutation (Rabinovitch, 2008). Thus several factors tightly related to PAH in patients and animal models have been described such as mutations or down-regulation of bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2), PA endothelial dysfunction, lung inflammation, reduced K_v current density in PA smooth muscle cells (PASMC) associated to mutations or down-regulation of K_v1.5 channels, as well as an imbalance between circulating vasoconstrictor and vasodilator agents (Humbert *et al.*, 2004; Mandegar *et al.*, 2004; Chan and Loscalzo, 2008; Morrell *et al.*, 2009; Simonneau *et al.*, 2009; Remillard *et al.*, 2007).

Despite the fact that diabetes is strongly associated with systemic cardiovascular diseases the relationship with pulmonary vascular disease has been almost disregarded. Additionally, insulin resistance and obesity are strongly associated with cardiovascular morbidity.

Recent epidemiological studies suggest a link between diabetes and different forms of PH including PAH. Thus diabetic patients have a hypercoagulable state with a higher prevalence of pulmonary thromboembolism and PAH independently of coronary disease, heart failure, smoking or hypertension (Movahed *et al.*, 2005). Moreover, insulin resistance appears to be more common in patients with PH than in the general population (Zamanian *et al.*, 2009). Furthermore, PH is more severe in patients with chronic obstructive pulmonary disease when is associated with diabetes (Makarevich *et al.*, 2007). There is also experimental evidence linking type 2 diabetes with PH. Thus male ApoE^{-/-} mice on a high-fat diet, an animal model associated to insulin resistance developed PH as judged by elevated right ventricular systolic pressure that was prevented by the antidiabetic drug rosiglitazone (Hansmann *et al.*, 2007).

Our **hypothesis** is that diabetes mellitus could be a predisposing factor for the onset or development of PH, leading to functional, histological and molecular features of the earliest stages of PH.

The **general aim** of this thesis is to characterize the lung and PA alterations induced by type 1 diabetes and insulin resistance, focusing on the study of the characteristic features of PH and analyze the potential link between diabetes and PH. Therefore, the following specific aims are proposed.

In the streptozotocin-induced type 1 diabetes model and in the insulin resistance Zucker obese model we sought to:

1. Analyze the PA endothelial function, characterizing the production, bioavailability and effects of NO.

2. Study the PA responses to vasoconstrictors related to PH and the mechanisms involved.
3. Search for characteristic changes of PH such as BMPR2 expression, PASMC K_v density currents, expression of K_v1.5 channels and pulmonary vascular remodelling.
4. Measure the PAP directly or through indirect markers such as right ventricular systolic pressure (RVSP) and right ventricle (RV) hypertrophy.

During the second part of this work we proposed **new additional aims** in order to determine whether type 1 diabetes is an accelerating factor for PH development. For that purpose we choose a mild level of hypoxia (14% O₂) to compare the effects of type 1 diabetes and mild hypoxia separately, and the combination of both focusing on the following aims:

5. To analyze early alterations of PH such as PA endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodelling and other markers of PH (BMPR2, PASMC K_v density currents and lung inflammation).
6. To measure PAP, RVSP and RV hypertrophy as final evidences of the onset of PH.

Methods and results.

Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control (saline) and a type 1 diabetic group (70 mg/kg 1 streptozotocin). After 6 weeks, intrapulmonary arteries were mounted for isometric tension recording, and endothelial function was tested by the relaxant response to acetylcholine. Protein expression and localization were measured by Western blot and immunohistochemistry and superoxide production by dihydroethidium staining. PA from type 1 diabetic rats showed impaired relaxant response to acetylcholine and reduced vasoconstrictor response to the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME, whereas the response to nitroprusside and the expression of endothelial NO synthase remained unchanged. Endothelial dysfunction was reversed by addition of superoxide dismutase or the NADPH oxidase inhibitor apocynin. Increased superoxide production and expression of the NADPH oxidase regulatory subunit p47^{phox} were also found in PA from diabetic rats. Streptozotocin-treated rats showed a down-regulation of the lung bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2), up-regulation of 5-hydroxy-tryptamine receptors (5-HT_{2A}) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins as measured by Western blot analysis, and increased contractile responses to serotonin (5-HT) in isolated PA. The hyper-responsiveness to 5-HT was endothelium-independent and unaffected by inhibition of NO synthase but prevented by indomethacin, the selective COX-2 inhibitor N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methane sulfonamide (NS-398), superoxide dismutase, and the NADPH oxidase inhibitor apocynin or by chronic treatment with insulin. However, type 1 diabetic rats at 6 weeks did not develop elevated right ventricular pressure or pulmonary artery muscularization.

Large and small PA from the model of insulin resistance obese Zucker rat and their lean counterparts were mounted for isometric tension recording. mRNA and protein expression were measured by RT-PCR or Western blot, respectively. K_V currents were recorded in isolated PA smooth muscle cells using the patch clamp technique. Right ventricular wall thickness was similar in obese and lean Zucker rats. Lung BMPR2, K_V1.5 and 5-HT_{2A} receptor mRNA and protein expression and K_V current density were also similar in the two rat strains. In conductance and resistance PA, the similar relaxant responses to acetylcholine and nitroprusside and unchanged lung eNOS expression revealed a preserved endothelial function. However, in resistance (but not in conductance) pulmonary arteries from obese rats a reduced response to several vasoconstrictor agents (hypoxia, phenylephrine and 5-HT) was observed. The hyporesponsiveness to vasoconstrictors was reversed by L-NAME and prevented by the iNOS inhibitor 1400W.

In the last group of experiments male Wistar-Kyoto rats were randomly divided into a control (saline) and a diabetic group (70 mg/kg streptozotocin) followed for 4 weeks and exposed to normoxia or moderate normobaric hypoxia (14%) for another 2 weeks. Diabetes plus hypoxia induced a modest increase in diastolic and mean pulmonary artery pressure and right ventricular weight while the two factors alone had no significant effect. Both factors independently increased the muscularization of pulmonary arteries and downregulated BMPR2. Hypoxia but not diabetes strongly reduced K_V currents; and diabetes but not hypoxia induced PA endothelial dysfunction and increased lung myeloperoxidase activity.

Conclusions.

1. Pulmonary arteries of type 1 diabetic rats develop 1) endothelial dysfunction as a result of up-regulation of NADPH oxidase and increased ROS production, 2) an exaggerated response to 5-HT due to activation and augmented expression of COX-2, and 3) changes in lung protein expression characteristic of clinical and experimental PH. However, these alterations are insufficient to elevate pulmonary pressure.
2. In contrast to the results found in rat models of type 1 diabetes or other mice models of insulin resistance, the obese Zucker rats do not show any of the characteristic features of PH but rather a reduced PA vasoconstrictor response which is prevented by inhibition of iNOS.
3. The pattern of changes in markers of PH is different for moderate hypoxia and diabetes. Hypoxia but not diabetes strongly reduces K_v currents, and diabetes but not hypoxia induces pulmonary artery endothelial dysfunction. Both factors independently downregulate BMPR2 and induce pulmonary vascular remodelling. However, diabetes but not hypoxia induces pulmonary infiltration of macrophages which is markedly increased when both factors are combined. The combination of both factors is required to induce a moderate elevation in pulmonary arterial pressure.
4. Taken together, our data provide functional, molecular and histological evidences that further strengthen the link between diabetes and pulmonary vascular disease. This work highlights the role of diabetes mellitus as a predisposing factor leading to early pulmonary alterations that in association with other risk factors may accelerate the onset of PH.

ABREVIATURAS

5-HT , serotonina	DHE , dihidroetidio
5-HTT , transportador de la serotonina	DM1/2 , diabetes mellitus tipo 1/2
AA , ácido araquidónico	DMSO , dimetil sulfóxido
ACh , acetilcolina	EDGF , factor de crecimiento derivado de endotelio
ADN , ácido deoxirribonucleico	E.e.m , error estándar de la media
ADNc , ácido deoxirribonucleico codificante	Em , potencial de membrana
AGE , productos de glicosilación avanzada	EPOC , enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ALK , <i>activin like kinase</i>	ET (A,B) , receptores de la endotelina (A,B)
AMPc , adenosín monofosfato cíclico	ET -1 , endotelina -1
AP , arterias pulmonares	FAD , dinucleótido de adenina y flavina
ApoE , apolipoproteína E	FMN , flavin-mononucleótido
ARNm , ácido ribonucleico mensajero	GC , guanilato ciclase
ATP , adenosin trifosfato	Gc , gasto cardiaco
BAMBI , <i>BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor</i>	GMPc , guanosín monofosfato cíclico
BH₄ , tetrahidrobiopterina	HAP , hipertensión arterial pulmonar
BK_{Ca} , canales de potasio dependientes de Ca ²⁺ de conductancia alta	HIF , factor inducible por hipoxia
BMP , proteínas morfogenéticas óseas	HP , hipertensión pulmonar
BMPR1/2 , receptor tipo 1/2 de las proteínas morfogenéticas óseas	HPPN , hipertensión pulmonar persistente neonatal
[Ca²⁺]_i , concentración intracelular de calcio	I_{K(V)} , corriente K _V
CMLV , células de músculo liso vascular	IL-1/6 , interleuquina 1/6
COX-1/2 , ciclooxigenasa-1/2	IP , receptores por la prostaciclina
DAG , diacilglicerol	IP₃ , inositol trifosfato
	IV , relación intensidad-voltaje
	K_{2P} , canales de potasio con dominio de dos poros
	K_{ATP} , canales de potasio dependientes de ATP

K_{Ca} , canales de potasio dependientes de Ca ²⁺	PGH₂ , prostaglandina H ₂
K_{IR} , canales de potasio rectificadores internos	PGI₂ Prostaciclina
K_V , canales de potasio dependientes de voltaje	PKC , proteína Kinasa C
LO , lipooxigenasa	PLA₂ , fosfolipasa A 2
MAPK , kinasa de proteínas activadas por mitógenos	pO₂ , presión parcial de oxígeno
MPO , mieloperóxidasa	PPAR , receptores activados por la proliferación de peroxisomas
NADPH , nicotinamida adenina dinucleotido fosfato	PVD , presión ventricular derecha
NO , óxido nítrico	RAGE , receptores de AGE
NOS , sintasa de óxido nítrico (eNOS, endotelial; iNOS, inducible; nNOS, neuronal)	ROCK , Rho kinasa
NOX , homólogos de la NADPH oxidasa a nivel vascular	ROS , especies reactivas de oxígeno
NPS , nitroprusiato sódico	RT-PCR , transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa
nSMasa , efingomielinasa neutra	RVP , resistencia vascular pulmonar
PA , presión arterial	SOD , superóxido dismutasa
PAP , presión arterial pulmonar	TGF-β , factor de crecimiento transformante β
PAPD , presión arterial pulmonar diastólica	TNF-α , factor de necrosis tumoral α
PAPm , presión arterial pulmonar media	TP , receptores de TXA ₂ /endoperóxido
PAPS , presión arterial pulmonar sistólica	TPH , triptófano hidroxilasa
PDE , fosfodiesterasa	TRPC , <i>transient receptor potential channels</i>
PDGF , factor de crecimiento derivado de plaquetas	TX , tromboxanos
PEG , polietilenglicol	TXA₂ , tromboxano A ₂
PG , prostaglandinas	VD , ventrículo derecho
	VDGF , factor de crecimiento vascular
	VI+S , ventrículo izquierdo y septo
	VPH , vasoconstricción pulmonar hipóxica
	XO , xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

1. FISIOLÓGÍA DE LA CIRCULACIÓN PULMONAR.

Desde el momento del nacimiento, en el que realizamos la primera inspiración, se pone en marcha una compleja maquinaria perfectamente regulada, el aparato respiratorio. Abandonamos la cómoda vida fetal para enfrentarnos al medio exterior. Comienza a desalojarse el líquido pulmonar, que hasta ese momento ocupaba los espacios aéreos pulmonares, y entran en contacto por primera vez el aire alveolar y el lecho capilar pulmonar. Para dar comienzo a un apropiado intercambio gaseoso, la circulación pulmonar debe invertir su estado inmaduro de alta presión y bajo flujo. Durante los primeros minutos de vida, la resistencia vascular pulmonar se reduce y aumenta el flujo, gracias al aumento de la presión parcial de oxígeno y a la liberación de mediadores como el óxido nítrico, la prostaciclina y la bradicinina (Haworth, 1995; Fineman *et al.*, 1995; Shaul, 1999).

1.1. La circulación pulmonar.

La circulación pulmonar es un sistema de baja presión y alto flujo, encargado de transportar la sangre desoxigenada desde el ventrículo derecho a los alvéolos pulmonares y, una vez oxigenada en los pulmones, hacerla llegar a la aurícula izquierda. La sangre desoxigenada procedente de las partes superiores del cuerpo, incluidos la cabeza, cuello y extremidades superiores, es devuelta a la aurícula derecha a través de la vena cava superior. Mientras que la procedente del resto del cuerpo es devuelta a la aurícula derecha a través de la vena cava inferior. Una vez que la aurícula derecha está llena, se contrae propulsando la sangre hasta el ventrículo derecho pasando por la válvula tricúspide. La sangre contenida en el ventrículo derecho es bombeada, atravesando la válvula pulmonar, hasta alcanzar la arteria pulmonar principal o tronco pulmonar. El tronco pulmonar se divide en una rama derecha y otra izquierda, cada una de la cuales se introduce

dentro de un pulmón. Las arterias pulmonares se distribuyen paralelas a las vías aéreas dividiéndose y subdividiéndose en arterias de calibre cada vez menor, hasta formar un vasto entramado de capilares alrededor de los alvéolos. Es en estos capilares donde tiene lugar el intercambio gaseoso de CO₂ por O₂. Los capilares se reúnen en vénulas, y después en venas de calibre cada vez mayor que discurren por la pleura y por el tejido conjuntivo intersegmentario. Aproximándose al hilio, siguen las ramas de los bronquios y acaban dando lugar a las venas pulmonares que salen de cada pulmón hacia la aurícula izquierda.

1.2. Las arterias pulmonares.

Las arterias pulmonares (AP) comparten una estructura básica similar a la del resto de los vasos (figura I-1). En contacto directo con la sangre existe una lámina íntima, formada por una monocapa de células endoteliales. A continuación, la lámina elástica interna da paso a la capa media formada principalmente por células de músculo liso vascular (CMLV). Las CMLV confieren al tejido capacidad contráctil que permite regular el diámetro de la luz del vaso, modificando el flujo vascular. Siguiendo a la lámina media se encuentra la lámina elástica externa, que da paso a la capa más externa, la lámina adventicia. Esta última capa está compuesta por tejido conectivo, fibras elásticas y de colágeno, fibroblastos y en ocasiones adipocitos. Por tanto, las arterias pulmonares y las sistémicas tienen una estructura similar. Sin embargo, las arterias pulmonares poseen una lámina media más delgada y son más elásticas que sus homólogas sistémicas.

En relación a la estructura anatómica podemos clasificar las arterias pulmonares (AP) humanas en:

- Las AP elásticas, también conocidas como arterias de conductancia (Haworth, 1995), cuyo diámetro es superior a 3000 μm .
- Las AP de transición con un diámetro entre 3000 μm y 2000 μm .
- Las AP musculares con un diámetro entre 2000 μm y 150 μm , donde las CMLV constituyen el componente mayoritario de la capa media.
- Las AP parcialmente musculares, definidas también como arterias de resistencia, con un diámetro entre 180 μm y 100 μm , que presentan una capa muscular de disposición espiral (Mulvany y Aalkjaer, 1990).
- Las AP no musculares de diámetro inferior a 100 μm .

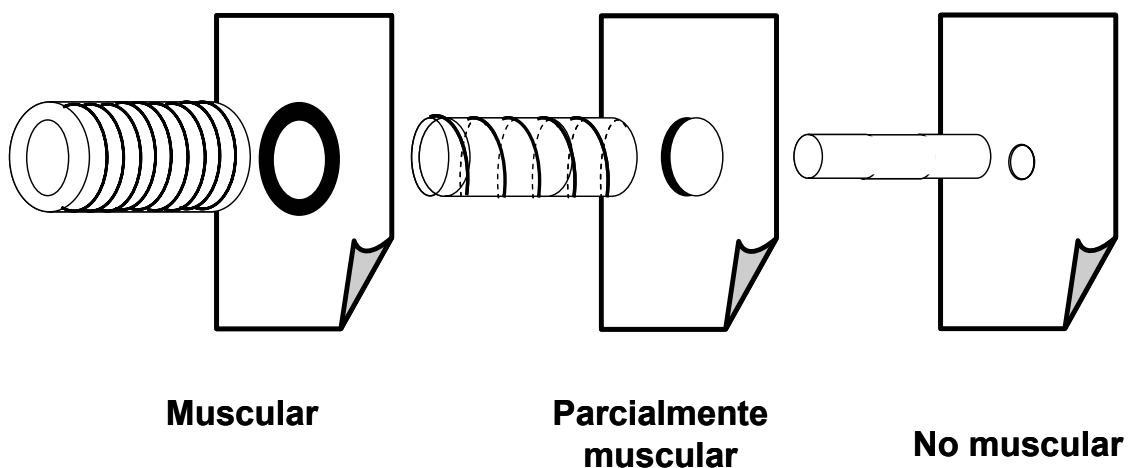


Figura I-1. Ilustración que representa las porciones muscular, no muscular y parcialmente muscular de una AP y su aspecto en cortes transversales. La identificación en cortes transversales de una capa media continua (muscular), en espiral (parcialmente muscular) o la ausencia de la capa media (no muscular) permiten la clasificación de cada uno de los tipos de AP (Adaptado de Meyric et al., 1978).

1.3. La presión arterial pulmonar.

La presión arterial pulmonar (PAP) es el resultado del producto del gasto cardiaco (Gc) y de la resistencia vascular pulmonar (RVP), tal y

como se indica en la ecuación I-1. La PAP media en individuos sanos no sobrepasa los 20 mmHg. Sin embargo, puede verse ligeramente modificado por factores como la edad, la altitud y por aumentos del Gc durante el ejercicio físico (Mandegar et al., 2004). Estos datos de presión pulmonar contrastan mucho con los valores de presión sistémicos que pueden llegar a ser 5-6 veces superiores. Teniendo en cuenta que el gasto cardiaco es similar para la circulación pulmonar y en la circulación sistémica, podemos deducir que la baja PAP es debida a la reducida resistencia que presenta la vasculatura pulmonar. La vasculatura pulmonar es capaz de adaptarse a cambios del Gc, sin generar un aumento de la PAP mediante procesos de reclutamiento de vasos sin perfundir y distensión de arterias perfundidas. La ecuación de Poiseuille (ecuación I-2) determina la presión generada por un fluido circulando por un tubo. La aplicación de esta ecuación a la circulación pulmonar determina que la RVP es inversamente proporcional a la cuarta potencia del radio interno del vaso (r), ante factores como la longitud del tejido (L) o la viscosidad de la sangre (η), cuya variación es escasa salvo cambios en el hematocrito o en la temperatura corporal. Por tanto podemos decir que la RVP es extremadamente sensible a los cambios de diámetro de la vasculatura pulmonar.

Ecuación I-1.

$$PAP = Gc \times (RVP_{\text{arterias}} + RVP_{\text{capilares}} + RVP_{\text{venas}})$$

Ecuación I-2. Ecuación de Poiseuille.

$$RVP = \frac{8L\eta}{\pi} \times \frac{1}{r^4}$$

1.4. Regulación de la circulación pulmonar.

La circulación pulmonar puede ser regulada por mecanismos pasivos o por mecanismos activos. Los mecanismos pasivos hacen referencia a

aquéllos que llevan a un cambio en la RVP, sin implicar cambios en el tono vascular. Dentro de este grupo están incluidos la distensión y el reclutamiento de arterias por la fuerza de la gravedad, la obstrucción de las vías aéreas, cambios en el gasto cardiaco, la presión auricular izquierda, la presión de las vías aéreas y del líquido intersticial.

Dentro de los mecanismos activos podemos distinguir:

Control nervioso:

La vasculatura pulmonar está innervada tanto por fibras simpáticas (adrenérgicas) como por fibras parasimpáticas (colinérgicas), aunque existen claras diferencias entre especies. La estimulación de las terminaciones simpáticas produce un aumento de la rigidez de la pared de las arterias de mayor calibre y vasoconstricción pulmonar. Las terminaciones simpáticas y parasimpáticas son más numerosas en las arterias elásticas, escasas en las musculares y ausentes en los vasos con un diámetro < 30 μM , así como en las vénulas y las venas.

Gases respiratorios:

La vasculatura pulmonar está bajo la influencia activa de los gases respiratorios. Tanto niveles elevados de CO_2 como niveles bajos de O_2 , producen vasoconstricción de la vasculatura pulmonar. La vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), descubierta en 1947 por Von Euler y Liljestrand, es un mecanismo fisiológico que permite derivar el flujo sanguíneo de zonas poco ventiladas a zonas mejor ventiladas, mejorando de esta forma el acoplamiento de ventilación-perfusión y maximizando la oxigenación sanguínea. La VPH ocurre principalmente en arterias precapilares de pequeño calibre, cuando la PO_2 cae por debajo de 60 mmHg (Barnes y Liu, 1995; Tortora y Grabowski, 2002).

Mediadores vasoactivos:

Un gran número de sustancias endógenas presentes en la sangre circulante son capaces de regular el tono vascular mediante la acción sobre sus respectivos receptores. Algunas de ellas están resumidas en la tabla I-1.

Tabla I-1. Agentes reguladores del tono vascular pulmonar, los receptores sobre los que actúan, sus efectos y dependencia de endotelio.

Mediadores vasoactivos a nivel pulmonar			
Agente	Receptor	Respuesta	Dependencia de endotelio
Adenosina	A ₁	Contracción	No
	A ₂	Relajación	No
Angiotensina	AT	Contracción	No
ANP (<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>)	ANP _A	Relajación	No
	ANP _B	Relajación	No
Bradicinina	B ₁	Relajación	Si
	B ₂	Relajación	Si
Endotelina	ET _A	Contracción	No
	ET _B	Relajación	Si
Histamina	H ₁	Contracción	No
	H ₂	Relajación	Si
Serotonina	5-HT ₁ , 5-HT ₂	Contracción	No
	5-HT _{1C}	Relajación	Si
Tromboxano	TP	Contracción	No
Vasopresina	V ₁	Relajación	Si
Prostagliclina	IP	Relajación	No
PGF _{2α}	FP	Contracción	No

2. LA HIPERTENSIÓN PULMONAR.

2.1. Clínica y clasificación.

La hipertensión pulmonar (HP) se caracteriza por una elevación mantenida de la presión arterial pulmonar media por encima de 25 mmHg en situación de reposo (Rich *et al.*, 1987). La HP puede desarrollarse como consecuencia de una gran variedad de alteraciones. Durante el 4º *simposium* mundial de la HP desarrollado en 2008 en Dana Point (California), un grupo de expertos actualizaron la clasificación previa del 2003 de Venecia, reorganizando todas las etiologías causantes de HP e integrando los conocimientos nuevos desarrollados (Tabla I-2). Se establecieron 5 categorías: Hipertensión arterial pulmonar (HAP), HP asociada a enfermedad cardíaca, HP asociada a enfermedades pulmonares y/o hipoxemia e HP debida a enfermedad trombótica y/o embolismo crónico y la HP multifactorial (Simonneau *et al.*, 2009). La primera categoría, la HAP, incluye un grupo heterogéneo de condiciones patológicas que comparten una vasculopatía pulmonar, con características morfológicas, datos clínicos y respuestas farmacológicas similares. Cuando no es posible encontrar una causa demostrable, se denomina HAP idiopática. Aproximadamente un 10% de estos pacientes presentan un historial familiar de la enfermedad, es decir, es posible encontrar una base genética en cuyo caso se denomina HAP heredable. Cuando la HAP aparece como consecuencia de otra enfermedad cardiopulmonar hablamos de HAP secundaria. Entre los procesos que pueden dar lugar al desarrollo de un cuadro de HAP se encuentran las alteraciones del colágeno, el cortocircuito izquierdo-derecho congénito, la hipertensión portal, la infección por HIV o la inducida por fármacos o drogas (derivados anfetamínicos).

Tabla I-2. Última clasificación de la HP (Dana Point, California, 2008).

Clasificación de la HP de Dana Point, 2008.
1. Hipertensión arterial pulmonar <ul style="list-style-type: none"> 1.1 Idiopática (HAPI) 1.2 Heredable <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1 Mutaciones de BMPR2 1.2.2 Mutaciones de ALK1 (con o sin telangectasia hemorrágica hereditaria) 1.2.3 Desconocida 1.3 Inducida por fármacos o toxinas 1.4 Asociadas <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1 Enfermedades del tejido conectivo 1.4.2 Infección por VIH 1.4.3 Hipertensión portal 1.4.4 Enfermedad cardíaca congénita 1.4.5 Esquistosomiasis 1.4.6 Anemia hemolítica crónica 1.5 Hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN)
1' Enfermedad pulmonar veno-oclusiva y hemangiomatosis capilar pulmonar
2. Hipertensión pulmonar debida a enfermedad cardíaca izquierda <ul style="list-style-type: none"> 2.1 Disfunción sistólica 2.2 Disfunción diastólica 2.3 Enfermedad valvular
3. Hipertensión pulmonar debida a enfermedad pulmonar o hipoxia <ul style="list-style-type: none"> 3.1 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica 3.2 Enfermedad intersticial pulmonar 3.3 Otras enfermedades pulmonares con patrones restrictivos y obstructivos mixtos 3.4 Trastornos respiratorios del sueño 3.5 Trastornos de hipoventilación alveolar 3.6 Exposición crónica a altitud elevada 3.7 Alteraciones del desarrollo
4. Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica
5. Hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales <ul style="list-style-type: none"> 5.1 Alteraciones hematológicas: alteraciones mieloproliferativas, esplenectomía 5.2 Alteraciones sistémicas: sarcoidosis, histiocitosis de células de Langerhans 5.3 Alteraciones metabólicas: tiroideas, Gaucher, almacenamiento de glucógeno 5.4 Otros: obstrucción tumoral, fallo renal crónico con hemodiálisis, mediastinitis fibrosante

2.2. Epidemiología y supervivencia.

Los signos y síntomas de la HP son inespecíficos al inicio de la enfermedad, lo que dificulta su diagnóstico. Según avanza la enfermedad, los pacientes presentan síntomas tales como disnea, fatiga, edema y síncope. La incidencia y la prevalencia de esta enfermedad se estima que es de entre 2-8 casos/millón/año y de 15-26 casos/millón, respectivamente y según las poblaciones estudiadas (Lourenço *et al.*, 2012). La edad media de diagnóstico es de 36 años y se ha observado una mayor frecuencia en mujeres que en hombres (aproximadamente 2:1) (Rabinovitch *et al.*, 2008). Se estima que el tiempo de supervivencia medio es de 3 años, con una tasa de supervivencia del 34% a los 5 años (Lourenço *et al.*, 2012; D'Alonzo *et al.*, 1991). Un estudio reciente ha correlacionado pequeños aumentos de la PAP sistólica con un impacto negativo en la supervivencia de la población en general, independientemente de otros factores de riesgo conocidos, y de la misma manera que la hipertensión arterial sistémica esencial (Lam *et al.*, 2009). Estos datos destacan que incluso cambios en la PAP dentro de los rangos considerados fisiológicos, pueden determinar un factor de riesgo de mortalidad cardiovascular.

2.3. Fisiopatología de la HP.

La HP es una alteración progresiva y crónica que afecta principalmente a las arterias de pequeño calibre (<300 µm). La patología fue descrita por primera vez por Romberg y Eisenmenger a finales del siglo XIX. Se caracteriza por vasoconstricción, remodelado vascular y trombosis (figura I-2). Sin embargo, la fisiopatología no es del todo bien conocida en la actualidad. A continuación, se describen los rasgos más característicos que definen la patología de la HP.

2.3.1 Desequilibrio entre vasoconstricción y vasodilatación. El desequilibrio entre factores vasoconstrictores y vasodilatadores, es considerado uno de los procesos tempranos en el aumento de la PAP. Se ha descrito que los pacientes con HP tienen un desequilibrio en la relación de $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ en sangre (Christman et al., 1992; Morrel *et al.*, 2009). Igualmente en pulmones de pacientes con HP, así como en modelos animales de HP inducido por hipoxia, se ha observado un aumento de la expresión de endotelina 1 (ET-1) y de sus receptores. (Giaid *et al.*, 1993, Li et al., 1994). La vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) es un mecanismo fisiológico único de la vasculatura pulmonar. Sin embargo, en condiciones de exposición crónica a hipoxia (apnea del sueño, altura) tiene lugar una VPH generalizada que favorece la aparición de HP. Por otro lado, los pacientes con HP tienen alteraciones en la síntesis, disponibilidad y/o actividad del NO, que determinan una marcada disfunción endotelial de las AP (Humbert *et al.*, 2004). Igualmente, se han descrito niveles elevados de serotonina (5-HT), así como alteraciones en los transportadores y receptores de 5-HT en pacientes con HP (MacLean y Dempsie, 2009)

2.3.2 Remodelado vascular pulmonar. En condiciones fisiológicas, en las AP existe un equilibrio entre los procesos proliferativos y apoptóticos en fibroblastos, células endoteliales y CMLV presentes en las AP. La proliferación celular contribuye a los cambios estructurales asociados con el inicio y la progresión de la HP. Igualmente, el desequilibrio de los factores vasoactivos afecta al remodelado vascular, mediante la estimulación de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Mandegar et al., 2004). Las proteínas de la matriz desempeñan también un papel importante en el remodelado vascular. La elastasa y las metaloproteinasas de la matriz permiten el remodelado de la matriz extracelular, la migración celular y el crecimiento de las CMLV. La actividad aumentada de la elastasa da lugar a liberación de factores de crecimiento a la matriz extracelular y la activación de metaloproteasas de matriz (MMPs) (Jones *et al.*, 1997)

2.3.3 Procesos inflamatorios. En los últimos años ha cobrado un creciente interés el papel del estado inflamatorio como responsables de las alteraciones de la HP, más que constituir una mera consecuencia. Las interacciones entre las plaquetas circulantes y las células inflamatorias en la pared vascular pueden contribuir también de forma importante a las alteraciones funcionales y estructurales de los vasos pulmonares (Tuder *et al.*, 1994; Cool *et al.*, 1999). De hecho, en pacientes con HP se han detectado autoanticuerpos circulantes en sangre, así como niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6). En estos pacientes, análisis histológicos posteriores revelaron la aparición de infiltrados inflamatorios de linfocitos y macrófagos (Dorfmüller *et al.*, 2003).

2.3.4 Trombosis. Las lesiones trombóticas y las alteraciones plaquetarias desempeñan un papel importante en la HP. Existen evidencias de alteraciones en la coagulación intravascular en pacientes con HP, caracterizada por una actividad procoagulante y una actividad fibrinolítica alterada. Está ampliamente aceptada la idea de que el estrés de cizallamiento al que están sometidas las AP o el daño en el tejido pulmonar, genera superficies trombogénicas. Por otro lado, las plaquetas participan tanto en los procesos trombóticos como en los proliferativos y vasoconstrictores mediante la liberación de factores de crecimiento (PDGF, TGF- β , VEGF), 5-HT y TXA₂. En la mayoría de los casos, sin embargo, no está muy claro si estas alteraciones plaquetarias y trombóticas son realmente causa o consecuencia en la génesis de la HP (Hervé *et al.*, 2001).

2.3.5 Factores genéticos. El entendimiento del mecanismo de la predisposición genética al desarrollo de HP es de vital importancia para la identificación de la raíz de la patogénesis. La mayoría de las mutaciones asociadas a HP idiopática y heredable están relacionadas con los receptores de la superfamilia del factor de crecimiento

transformante β (TGF- β) y con sus proteínas de señalización [endoglina, ALK-1 (*activin like kinase 1*), receptor tipo 1 y 2 de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPR1 y BMPR2), Smad-8] (Chan y Loscalzo, 2008). Por otro lado, también se han encontrado mutaciones en genes relacionados con vías implicadas en el control del tono vascular (enzima convertidora de angiotensina, receptor II de angiotensina (Machado *et al.*, 2009; Fessel *et al.*, 2011). El análisis del árbol genealógico ha demostrado una herencia autosómica dominante pero con penetrancia variable, ya que sólo un 10-20% de los portadores de las mutaciones desarrollan HP. Tanto mutaciones en el gen que codifica para BMPR2 como polimorfismos en el gen del transportador de 5-HT (5-HTT) se han relacionado con alteraciones en la proliferación de CMLV y células endoteliales (Morrel *et al.*, 2001; Atkinson *et al.*, 2001; Eddahibi *et al.*, 2001). De hecho, mutaciones en el gen que codifica el BMPR2 dan lugar a un aumento de la proliferación y disminución de la diferenciación (Yang *et al.*, 2005) y se han relacionado con más del 80% de los casos de HP heredable (Lane *et al.*, 2000, Morrell *et al.*, 2001 y 2006) Mientras que se han encontrado polimorfismos en 5-HTT en un 65% de los casos, sugiriendo que alteraciones en este transportador podrían afectar a la susceptibilidad para desarrollar HP hipóxica (Eddahibi *et al.*, 2001 y 2003). Existen además otras alteraciones genéticas que predisponen al desarrollo de HP como son los polimorfismos de la subunidad Kv1.5 del canal de potasio voltaje dependiente (Yuan *et al.*, 1998, Burg *et al.*, 2010) y de los canales de cationes TRP, ambos implicados en la contracción y en el remodelado vascular (MacLean y Dempsie, 2009)

2.3.6 Hipertrofia ventricular derecha. Las alteraciones descritas anteriormente llevan a un aumento de RVP. Independientemente de la causa, el aumento de la PAP tiene un efecto devastador sobre el corazón. La HP genera un aumento de la presión en el ventrículo derecho (VD), debido al aumento de trabajo de carga que debe realizar para superar la presión en las AP. Con el tiempo da lugar a

insuficiencia cardiaca derecha, la cual es frecuentemente la causa de fallecimiento de los pacientes con HP (Mandegar *et al.*, 2004).

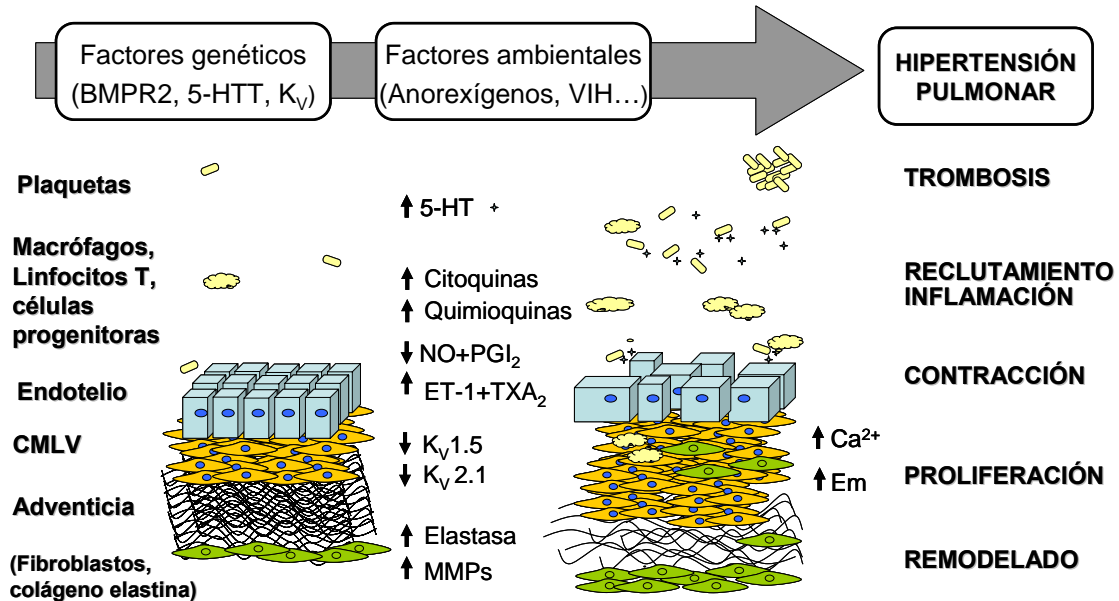


Figura I-2: Mecanismos propuestos en la génesis de la hipertensión pulmonar. Entre estos se encuentran un genotipo permisivo, la disfunción endotelial y factores desencadenantes ambientales (CMLV, células de músculo liso vascular; Em, potencial de membrana; MMPs, metaloproteinasas de matriz)

2.4. Tratamiento.

A) Terapia vasodilatadora.

En la actualidad, la opción terapéutica más utilizada es aquella que persigue la restauración del equilibrio entre los mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores liberados por el endotelio, con el empleo de antagonistas del receptor de endotelina (bosentan) o vasodilatadores como los bloqueantes de canales de Ca²⁺ (nifedipino, diltiazem), el NO inhalado, la prostaciclina (PGI₂) y sus análogos (epoprostenol) o los inhibidores de fosfodiesterasa 5 (sildenafil, tadalafilo). A lo largo de estos últimos años se ha sugerido que gran

parte de los efectos beneficiosos de estos fármacos se deben a la acción que presentan sobre el remodelado vascular. Tradicionalmente los pacientes han sido clasificados según su respuesta a la terapia vasodilatadora a NO inhalado o antagonistas del Ca^{2+} . Los fármacos vasodilatadores son una buena herramienta pero, dependiendo del mecanismo que produce el aumento de PAP, no siempre producen una vasodilatación efectiva. Por otro lado la falta de selectividad por la vasculatura pulmonar se manifiesta con la aparición de efectos secundarios a nivel sistémico.

Análogos de prostaciclina (PGI_2). La PGI_2 es una sustancia producida por las células endoteliales que presenta acciones vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas. Uno de los grupos de fármacos de elección en el tratamiento de la HP lo constituyen los análogos de la PGI_2 , entre los que cabe destacar el epoprostenol por ser uno de los primeros de este grupo en desarrollarse en la terapia de la HP (Galié *et al.*, 2004). Posteriormente se han desarrollado moléculas como el trepostinil, el beraprost y el iloprost, con semividas superiores al del epoprostenol.

Activadores/potenciadores de la vía NO/GMPc. Los fármacos vasodilatadores que actúan sobre la vía NO/GMPc, son capaces de reducir la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con efectos parciales sobre la sensibilidad al Ca^{2+} . El NO inhalado tiene un uso limitado dada su toxicidad y su efecto rebote tras la retirada. Es usado exclusivamente como tratamiento agudo y en la HP persistente neonatal, donde se ha demostrado un mayor beneficio. Los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) producen un efecto vasodilatador reduciendo la degradación de GMPc. Se consideran fármacos de primera elección, solos o en combinación con antagonistas de los receptores de endotelina.

Antagonistas del Ca^{2+} . Los antagonistas del Ca^{2+} han demostrado ser muy efectivos reduciendo los niveles de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}_i]$, pero son poco efectivos para relajar el componente vasoconstrictor que implica la sensibilización de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} . Además, su utilidad está limitada ya que sólo un reducido porcentaje de los pacientes con HP responden al tratamiento con este tipo de fármacos.

Antagonistas de los receptores de endotelina. El bosentan (antagonista competitivo de los receptores de la endotelina ET_A y ET_B), y el ambrisetán (selectivo de ET_A), son hasta la fecha los únicos antagonistas de receptores de la endotelina aprobados para el tratamiento de la HP. Sin embargo, estos fármacos no son vasodilatadores en el sentido estricto de la clasificación.

B) Terapia anti-proliferativa.

Existe un creciente interés por este tipo de terapias dada la fisiopatología, centrando las estrategias en la reversión de la patología. En modelos animales se ha demostrado que el bloqueo de factores de crecimiento como PDGF y VEGF, puede revertir la PH (Schermuly *et al.*, 2005, Klein *et al.*, 2008). El inhibidor de los receptores de PDGF imatinib, ha demostrado beneficios en estudios de fase II desarrollados en pacientes con HP.

C) Transplante de pulmón.

Esta terapia es la última a la que se recurre, y normalmente se realiza sólo en pacientes que no han respondido a ninguna de las terapias anteriores. Los principales inconvenientes son la falta de donantes y el rechazo del transplante.

En resumen, la HP se caracteriza por un desequilibrio de origen genético y/o ambiental, al que contribuyen un conjunto de factores que generan un aumento del tono y remodelado vascular, lesiones plexiformes, procesos trombóticos e inflamatorios. Estas alteraciones dan como resultado final una disminución del lumen de las AP, un aumento de la PAP e hipertrofia ventricular derecha.

Dada la complejidad de esta patología y de los diferentes factores que en ella participan, en la siguiente parte de esta Tesis Doctoral se revisaran detalladamente aquellos factores más relevantes y su contribución al desarrollo de la patología de la HP.

3. CONTRIBUCIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL A LA PATOGÉNESIS DE LA HP.

El término disfunción endotelial hace referencia a una de condición patológica de las células endoteliales que implica alteraciones en el control del tono vascular, alteración en la regulación del remodelado vascular y pérdida de las funciones antiagregantes plaquetarias y antiinflamatorias del endotelio.

3.1. El endotelio.

El endotelio es una monocapa de células que tapiza la cara interna de los vasos, con reconocidas funciones endocrinas y paracrinas. En el endotelio existe un estrecho equilibrio entre factores vasoconstrictores y proliferativos, frente a los factores vasodilatadores y proapoptóticos, que controla la homeostasis vascular, el tono vascular, la inflamación y la reparación tisular. En él, se regula el tono vascular por medio de la producción de sustancias vasodilatadoras (NO, PGI₂, EDHF, bradicinina) y vasoconstrictoras (ET, TXA₂). Igualmente, el endotelio libera factores de crecimiento (EDGF) que regulan la proliferación de CMLV. La proliferación excesiva de células endoteliales junto con la neoangiogénesis, dan lugar a la formación de lesiones plexiformes características de las AP en pacientes con HP.

3.2. La vía del óxido nítrico (NO).

El NO se genera a partir del aminoácido L-arginina, mediante la actuación de un grupo de enzimas denominadas NO sintasas (NOS). Asimismo, se requiere la presencia de los cofactores tetrabiopterina (BH₄), dinucleótido de adenina y flavina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de nicotinamida y adenina monofosfato (NADPH). Se han descrito tres isoformas de NOS. La NOS-3 o eNOS, expresada principalmente en el endotelio, la NOS-1 o nNOS, de localización principalmente neuronal y la NOS-2 o iNOS, cuya expresión

es inducida en diferentes tipos de tejidos en respuesta a estímulos como citoquinas y endotoxinas. El NO generado por la eNOS y la nNOS, participa del mantenimiento del tono vascular y de la transducción neuronal, respectivamente. A diferencia de las primeras, la iNOS es una isoforma independiente de calcio y por tanto su función no se regula por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. La iNOS genera gran cantidad de NO durante largos periodos de tiempo, siendo la isoforma predominante en los procesos inflamatorios (Xie y Nathan, 1994).

Independientemente de su origen, el NO ejerce sus acciones mediante la activación de la guanilato ciclasa (GC) y el aumento de los niveles de GMP cíclico (GMPc), o bien mediante la nitrosilación de proteínas (Hobbs e Ignarro, 1996; Sugiura e Ichinose, 2011; Hobbs, 1997). El NO es un gas biológicamente activo con diferentes papeles fisiológicos y fisiopatológicos en los sistemas inmune, nervioso y cardiovascular. Sus efectos a nivel vascular son vasodilatación, inhibición del crecimiento y migración celular, inhibición de la producción de proteínas de matriz e inhibición de la agregación plaquetaria (Singh y Evans, 1997). Por tanto, la disminución de la producción o disponibilidad de NO a nivel pulmonar puede contribuir al desarrollo de HP. De hecho, ratones transgénicos carentes de la eNOS desarrollan HP por hipoxia moderada, que es revertida por la inhalación de NO (Fagan *et al.*, 1999; Steudel *et al.*, 1998) o por la administración de su precursor L-arginina (Mitani *et al.*, 1997). Estudios clínicos y experimentales indican que en diversas formas de HP, incluyendo la HPPN, existe un déficit de actividad del NO (Humbert *et al.*, 2004; Villamor *et al.*, 1997). Sin embargo, los niveles de expresión de la eNOS se encuentran elevados en las AP de resistencia de diferentes modelos de HP, incluyendo la HP inducida por hipoxia crónica (Le Cras *et al.*, 1996), la inducida por monocrotalina (Tyler *et al.*, 1999; Resta *et al.*, 1997) y en el modelo de ratas *Fawn-Hooded* (Tyler *et al.*, 1999). Por último, la administración del precursor de NO L-arginina, disminuye la PAP y las RVP en humanos con HP (Mehta *et al.*, 1995; Nagaya *et al.*, 2001).

3.3. La endotelina (ET).

La ET es un péptido cuyo principal lugar de síntesis y liberación es el endotelio. Existen tres isoformas de la ET (ET-1, ET-2, ET-3), de las que cabe destacar la ET-1 por su amplia implicación en patologías cardiovasculares (Kedzierski *et al.*, 2001). Se ha descrito la existencia de dos receptores que median los efectos de ET-1 (ET_A y ET_B). El efecto neto producido por la ET-1 viene determinado por la localización de los receptores, y por el equilibrio entre sus dos receptores. Su principal efecto sobre el tono vascular es la vasoconstricción vía ET_A, aunque también produce liberación de vasodilatadores del endotelio por medio del receptor ET_B. La ET-1 genera remodelado vascular y síntesis de la matriz extracelular (Rodríguez-Vita *et al.*, 2005), así como producción de factores de crecimiento (Hahn *et al.*, 1991). Por otro lado, estimula la función mitocondrial y la formación de ROS (Yuhki *et al.*, 2001). En las AP, la ET-1 produce vasoconstricción pulmonar (Deuchar *et al.*, 2002) y proliferación de las CMLV (Davie *et al.*, 2002). Su expresión está aumentada en condiciones de hipoxia (Li *et al.*, 1994), en modelos animales de HP (Frasch *et al.*, 1999) y en el endotelio de pacientes con HP (Giaid *et al.*, 1993). En base al papel de la ET-1 en la fisiopatología de la HP se han desarrollado antagonistas de sus receptores como el bosentán (no selectivo) y el ambrisentán (selectivo por ET_A), de uso en la terapia de la HP.

3.4. Los prostaglandinos.

Los prostaglandinos son producidos en casi todas las células y están involucrados en la mayoría de las funciones orgánicas. La formación de prostaglandinos depende principalmente de tres factores: (1) la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A₂ celulares, (2) el contenido celular de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) que producen PGH₂ y (3) la expresión relativa en cada tipo celular de las enzimas que metabolizan la PGH₂ para dar los

distintos tipos de prostaglandinas y tromboxanos. Los productos del metabolismo del AA, la PGI₂ y el TXA₂ presentan efectos contrapuestos sobre la pared vascular (Vane y Botting, 1995).

3.4.1. La ciclooxygenasa (COX). Las prostaglandinas y los tromboxanos son sintetizados a partir del AA por la COX, de las que clásicamente se distinguen dos isoformas, la COX-1 y la COX-2 con distintas características en cuanto a su regulación, distribución tisular y sensibilidad a fármacos (Mitchell y Warner, 1999; Mollace *et al.*, 2005). La COX-1 es generalmente activa de forma constitutiva participando en la regulación homeostática, mientras que la COX-2 es inducida por estímulos como son los mediadores inflamatorios, citoquinas, 5-HT, factores de crecimientos, estrés oxidativo y estrés mecánico.

3.4.2. La PGI₂. La PGI₂ es un potente vasodilatador, inhibidor de la agregación plaquetaria y de la proliferación de las CMLV *in vitro* (Zucker *et al.*, 1998) y un mediador antitrombótico *in vivo* (Cheng *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004). Es generada en las células endoteliales por la enzima PGI₂ sintasa (PGI₂-S), la cual está disminuida en las AP de pacientes con HP (Tuder *et al.*, 1999). Igualmente, se han encontrado niveles bajos de PGI₂ en pacientes con HP (Christman *et al.*, 1992).

3.4.3. El TXA₂. El TXA₂ estimula la agregación plaquetaria y la mitogenesis, y produce vasoconstricción (Cheng *et al.*, 2002). El TXA₂ desempeña un papel muy importante en el control del tono vascular pulmonar en condiciones fisiológicas y patológicas. De hecho, alteraciones en sus niveles se han implicado en la génesis de diversas formas de HP (Christman *et al.*, 1992). Asimismo, se ha descrito una elevada producción de TXA₂ en pacientes con HP, apuntando a los macrófagos alveolares y las plaquetas como principales fuentes productoras (Robbins *et al.*, 2001). También se ha descrito un aumento de la activación de los receptores TP (Christman *et al.*, 1992; Weitzberg

et al., 1995; Orr *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Jankov *et al.*, 2002) y alteraciones en la densidad de los mismos (Katugampola y Davenport, 2001) en diversas enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatías, isquemia e HP.

3.5. Estrés oxidativo.

En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS) son generadas en bajas concentraciones, y sus niveles están cuidadosamente regulados. Las principales ROS producidas en la célula son: (1) el anión superóxido (O_2^-), generado a partir de la reducción del oxígeno molecular, (2) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generado a partir de O_2^- por medio de dismutación espontánea o enzimática, y (3) las especies reactivas de nitrógeno (*Reactive nitrogen species*, RNS). Las RNS proceden de la oxidación de NO dando lugar a nitritos y peroxinitritos, siendo estos últimos altamente reactivos. Niveles bajos de ROS juegan un papel fisiológico importante en el mantenimiento de la integridad cardiovascular, mientras que los niveles elevados de ROS han demostrado tener un papel fisiopatológico en la disfunción y remodelado cardiovascular, así como en enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Lambeth, 2007; Cohen y Tong, 2010; Satoh *et al.*, 2011). Se ha demostrado la participación de las ROS en procesos de proliferación y migración celular, hipertrofia, procesos inflamatorios, disfunción endotelial y aumento del tono vascular (Papaharalambus y Griending, 2007). Además, las ROS pueden activar otras fuentes productoras de estrés oxidativo, e inhibir a las enzimas antioxidantes, generando una retroalimentación positiva y una reacción de propagación (Le Cras y McMurtry, 2001; Faraci y Didion, 2004; Rathore *et al.*, 2008; Perez-Vizcaíno *et al.*, 2010; Dikalov, 2011).

3.5.1. Fuentes de estrés oxidativo. Entre las principales fuentes productoras de ROS se encuentran la NADPH oxidasa, la mitocondria, la NOS desacoplada y las COX.

La **NADPH oxidasa** es un complejo enzimático multimérico cuya función primordial es la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el oxígeno molecular, generando así O_2^- (figura I-3). Está compuesta por unas subunidades de membrana (p22^{phox} y NOX1-5) y unas subunidades citoplasmáticas (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac y Rap). La NADPH oxidasa se expresa en todas la células de la pared del vaso (células endoteliales, CMLV, fibroblastos y monocitos o macrófagos) y existen diferencias de expresión entre especies (Griendling *et al.*, 2000; Touyz *et al.*, 2002). La NADPH oxidasa puede activarse en respuesta a multitud de estímulos (angiotensina II, estrés mecánico, hipoxia, aldosterona, factores de crecimiento, etc) pero existe una isoforma (NOX-4) que está constitutivamente activa y que sólo requiere la asociación con p22^{phox}, resaltando la importancia de la producción basal de ROS (Ellmark *et al.*, 2005; Dikalov, 2011; Lassègue y Griendling 2010). Igualmente, las ROS generadas por la NADPH oxidasa están involucradas en la vasoconstricción de AP inducida por TXA_2 e hipoxia (Weissmann *et al.*, 2000; Cogolludo *et al.*, 2006b; Frazziano *et al.*, 2011). Asimismo, el estrés mecánico genera una continua producción de O_2^- dependiente de NADPH oxidasa en células endoteliales, que favorece la adhesión de monocitos mediada por el factor nuclear κB (NF- κB) (Hwang *et al.*, 2003). Modelos de ratones deficientes en p47^{phox} desarrollan un menor remodelado vascular y una menor activación de metaloproteinasas de matriz, en respuesta al estrés mecánico (Castier *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que la sobreexpresión de NOX produce un aumento de la presión arterial sistólica e hipertrofia cardíaca en respuesta a angiotensina (Laude *et al.*, 2005).

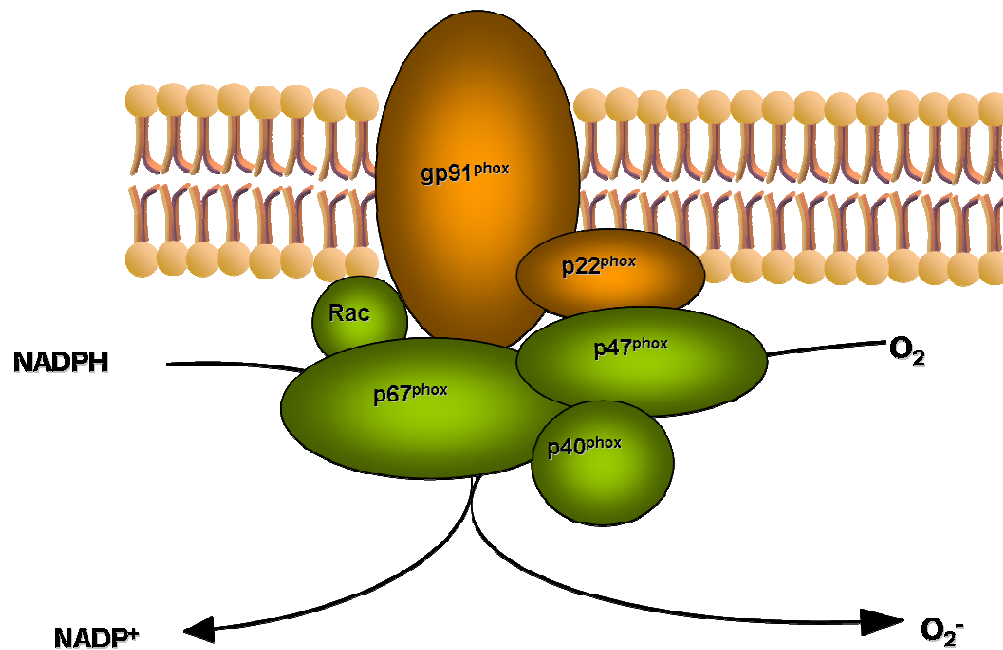


Figura I-3. Representación de la NADPH oxidasa activada generando aniones superóxido por medio del consumo de NADPH, contribuyendo de esta forma al estrés oxidativo.

La **mitocondria** es la organela celular responsable de la producción de ATP por fosforilación oxidativa, pero también es capaz de generar ROS. En la mitocondria se genera un flujo de electrones que parten del NADH hacia el complejo I, o bien desde el succinato hacia el complejo II. Desde ambos complejos se dirige al complejo III por medio de la reducción de la ubiquinona, para acabar en el complejo IV, el cual se encarga de la reducción del oxígeno molecular a agua. De esta forma se produce un gradiente electrónico en la cadena mitocondrial y se genera un potencial de membrana por el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. En condiciones fisiológicas las principales fuentes de O₂⁻ en la mitocondria son el complejo I y II, aunque también son generados en menor medida por el complejo III y diversas enzimas del ciclo de Krebs y de la oxidación β (Boveris *et al.*, 1984; Han *et al.*, 2003; St-Pierre *et al.*, 2002; Brand, 2010). La mitocondria está implicada en la respuesta vascular a hipoxia (Archer *et al.*, 1993; Perez-Vizcaino *et al.*, 2010, Zoer *et al.*, 2010) y cambios en su función podrían explicar la diferente respuesta a la hipoxia en las arterias sistémicas y AP

(Michelakis *et al.*, 2002a). Adicionalmente, se ha descrito una hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial en las CMLAP de pacientes con HP (Bonnet *et al.*, 2006), y en modelos animales de HP (McMurty *et al.*, 2004), que puede ser asociada a procesos proliferativos y de resistencia a la apoptosis (Dromparis *et al.*, 2010).

En condiciones fisiológicas la **NOS** se encuentra como un dímero, unido por un átomo de zinc coordinado con cuatro sulfuros (ZnS_4). Las enzimas NOS puede ser fuente de estrés oxidativo cuando están desacopladas, debido a la oxidación del núcleo ZnS_4 , por la oxidación de su cofactor la tetrahydropterina (BH_4) o en condiciones de deficiencia de cualquiera de sus cofactores (Zou *et al.*, 2002). Por otro lado, el propio NO generado se combina rápidamente con O_2 generando peroxinitritos. Los peroxinitritos generan disfunción endotelial y dan lugar a un aumento de la actividad proinflamatoria, activan las metaloproteinasas de matriz y estimulan la proliferación celular (Sugiura *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1997; Matata *et al.*, 2002).

Las enzimas **COX** son generadoras de ROS durante la segunda fase de la síntesis de los prostanoïdes, debido a su actividad peroxidasa (Kukreja *et al.*, 1986) y se ha demostrado que son fuente de ROS durante los procesos de maduración neonatal en las AP (Perez-vizcaïno *et al.*, 2002). Asimismo, uno de los principales productos de COX, el TXA_2 , es capaz de activar la NADPH oxidasa a través de sus receptores TP (Cogolludo *et al.*, 2006b).

3.5.2. Enzimas antioxidantes. Del proceso de disipación de las ROS se encarga un grupo de enzimas antioxidantes que catalizan las reacciones de dismutación del O_2^- a H_2O_2 , y de la reducción de este a H_2O . Las enzimas antioxidantes más importantes en el tejido vascular son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Existen tres isoformas de **SOD**: la SOD-1, de localización citosólica y con un núcleo de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$; la SOD-2 de localización mitocondrial y con un núcleo de Mn^{2+} y la SOD-3 de localización extracelular y con un núcleo de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$. Dada la compartimentalización de la producción de ROS, las enzimas SOD parecen desempeñar un papel muy destacado en la regulación localizada de los niveles de ROS a nivel fisiológico y patológico (Faraci y Didion, 2004). Dentro de las isoformas, la SOD-1 es la forma predominante en términos de función. De este modo la SOD-1 acapara el 50-80 % de la actividad total de SOD, mientras que las SOD-2 se encarga del 2-12 %, mientras que se achaca a la SOD-3 una menor participación (Guo *et al.*, 2001; Didion *et al.*, 2002). La importancia de SOD-1 se ve reflejada en que ratones deficientes en esta isoforma desarrollan una mayor disfunción endotelial, un aumento del tono miogénico y un aumento de la respuesta contráctil como consecuencia de la elevación de los niveles de ROS y peroxinitritos (Cooke *et al.*, 2003). Por otro lado, a pesar de la baja contribución de SOD-2 a la actividad total de SOD, los ratones deficientes en esta isoforma mueren a las pocas semanas del nacimiento presentando graves alteraciones cardíacas, neurodegeneración y daño mitocondrial (Faraci y Didion, 2004). La expresión de SOD-1 puede verse aumentada en células endoteliales humanas sometidas a estrés mecánico *in vitro* (Inoue *et al.*, 1996), mientras que la deficiencia de SOD-1 produce hipertrofia de arteriolas cerebrales (Baumbach *et al.*, 2003). Igualmente la expresión de SOD-2 se ve aumentada en condiciones de estrés oxidativo (Mac Millan-Crow y Cruthirds, 2001) y su actividad está reducida en presencia de RNS (Xu *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010).

Tanto la **catalasa** como la **glutathion peroxidasa**, se encargan de la eliminación de H_2O_2 mediante su reducción a H_2O . Ambas parecen regular la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Así, tanto la adición de catalasa o glutathion peroxidasa como su sobreexpresión disminuyen la VPH, mientras que la inhibición farmacológica o su delección genética aumentan la VPH (Monaco *et al.*, 1995; Frazziano *et al.*, 2011; Rathore *et al.*, 2008; Desiredi *et al.*, 2009).

4. CONTRIBUCIÓN DE LA 5-HT A LA PATOGÉNESIS DE LA HP.

4.1. Aspectos generales de la 5-HT.

La 5-HT es una amina biógena sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano. En la síntesis se produce una primera reacción de hidroxilación, etapa limitante catalizada por la triptófano hidroxilasa (TPH), seguida de una descarboxilación. Su síntesis se da principalmente en las células enterocromoafines del intestino, aunque también es sintetizada en el tejido neuroepitelial y neuroendocrino de las vías aéreas, así como en las células endoteliales de las AP (MacLean *et al.*, 2000, Eddahibi *et al.*, 2001). A nivel cardiovascular su principal reservorio son las plaquetas circulantes, las cuales contienen más del 99 % de la serotonina en sangre. Adicionalmente, se puede localizar a la 5-HT circulando libre en plasma, pero en concentraciones inferiores a 1 nM. Por otro lado existe un transportador de 5-HT (5-HTT) responsable de recaptar la 5-HT libre e introducirla en los reservorios descritos anteriormente. Existen 14 receptores de 5-HT diferentes, divididos en 7 familias (5-HT₁₋₇). En las AP cabe destacar principalmente el papel de los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B}. La participación de cada receptor depende de la especie, habiéndose demostrado una mayor participación de los receptores 5-HT_{1B} en humanos (MacLean *et al.*, 1996b, Morecroft *et al.*, 1999), de los 5-HT_{2A} en ratas (Cogolludo *et al.*, 2006a) y de los 5-HT_{2B} en ratones (Launay *et al.*, 2002).

4.2. Evidencias de la relación entre 5-HT e HP.

La 5-HT actúa como vasoconstrictor y estimulando procesos proliferativos en las CMLV (Lee *et al.*, 1998; Eddahibi *et al.*, 2006; MacLean y Dempsie, 2009). La relación que existe entre la 5-HT y la HP se puso en evidencia al descubrir que el uso de anorexigénicos con efectos serotoninérgicos indirectos, producían un aumento de la incidencia de HP (Tellier, 1999). Este hecho se demostró al comprobar

que los ratones carentes de TPH no desarrollaban HP al ser tratados con anorexígenos (Dempsey *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha visto un aumento de la expresión de TPH en los pulmones y células endoteliales de AP de pacientes con HP (Eddahibi *et al.*, 2006). Igualmente, se han encontrado niveles elevados de 5-HT en pacientes con HP idiopática (Herve *et al.*, 1995). Además, el tratamiento con inhibidores de los receptores de 5-HT y 5-HTT, reduce el desarrollo de HP en modelos animales (Guignabert *et al.*, 2005; Hironaka *et al.*, 2003). Asimismo, se ha visto que ratones deficientes en el transportador 5-HTT o de los receptores de 5-HT muestran una atenuación de la HP inducida por hipoxia (Launay *et al.*, 2002; Eddahibi *et al.*, 2000; Keegan *et al.*, 2001). Diversos estudios indican que los efectos proliferativos de la 5-HT requieren su internalización previa por medio del transportador 5-HTT. Asimismo, la 5-HT en el interior celular es capaz de activar mecanismos de sensibilización al calcio (MacLean y Dempsey, 2009; Liu *et al.*, 2004; McNamara *et al.*, 2008).

5. LOS CANALES K_v Y LA HP.

Se han descrito cinco tipos diferentes de canales de potasio en la CMLV: (1) los activados por voltaje o K_v , (2) los activados por Ca^{2+} o K_{Ca} , (3) los sensibles a ATP o K_{ATP} , (4) los de rectificación interna o K_{IR} y (5) los canales de potasio de dos poros o K_{2P} (Gurney y Manoury, 2009; Olschewski, 2010; Bonnet, 2007; Shimoda y Polak, 2011, Yuan et al., 1998; Remillard *et al.*, 2007). A pesar de que cada uno de ellos tiene relevancia a nivel vascular, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en los K_v por ser los canales de potasio que más se han implicado en la HP.

5.1. Conceptos generales de los canales K_v .

Los canales K_v son heterotetrámeros u homotetrámeros, compuestos de 4 subunidades α que forman el poro del canal, asociadas con 4 subunidades reguladoras β (figura I-4). Los canales K_v se caracterizan por su activación dependiente de voltaje y por su insensibilidad a los niveles de Ca^{2+} intracelular. Este grupo representa un importante componente de la corriente de salida de potasio en los tejidos vasculares (Nelson y Quayle, 1995). Los canales K_v puede ser clasificados en 2 grandes subgrupos según sus cinéticas de activación e inactivación: (1) K_v de rectificación tardía, que generan una corriente de activación lenta y con inactivación escasa (K_v1-6 , K_v8 y K_v9) o ausente ($K_v7.1-7.5$), y (2) K_v de tipo “A”, de rápida activación e inactivación (K_v10-12) (Gutman *et al.*, 2005). La corriente nativa de las CMLV de AP está compuesta por varios de estos canales, y la contribución de cada canal a esta corriente puede variar entre células (Bonnet y Archer, 2007). En CMLV de AP humanas se han descrito la expresión de al menos 22 subunidades α y 3 subunidades β (Firth *et al.*, 2011). Las subunidades β modifican la inactivación del canal, regulan su expresión en la superficie celular, sirven de unión del canal al citoesqueleto y a otras proteínas celulares, y pueden actuar como sensores de O_2 (Rettig

et al., 1994; Heinemann *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2010). La alta permeabilidad de la membrana celular al potasio establece el potencial de reposo de la mayoría de las células sea cercano al potencial de equilibrio del potasio (~ -90 mV). El potencial de reposo en las CMLV se sitúa entre -60 mV y -30 mV. Los canales K_v se activan por despolarización de la membrana en las CMLV en un rango fisiológico cercano al potencial de membrana en reposo, por esta razón se considera que actúan principalmente como un mecanismo de control frente a la despolarización y la vasoconstricción (Nelson y Quayle, 1995; Mackie y Byron, 2008)

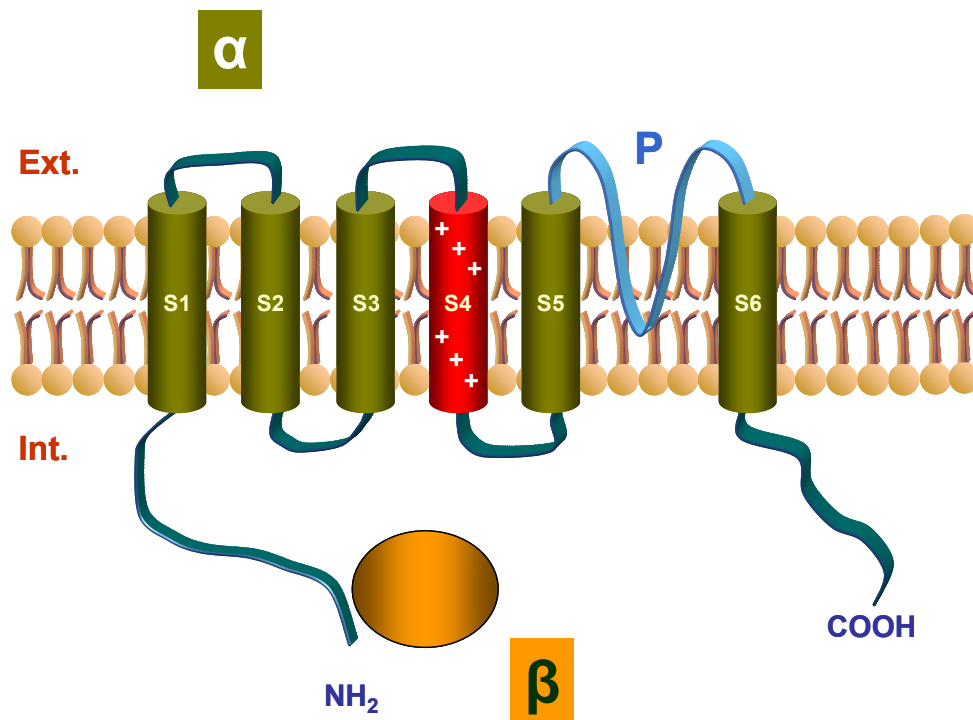


Figura I-4. Ilustración representativa de las subunidades α y β de los canales K_v . En la subunidad α se muestran sus seis segmentos transmembrana (S1-S6), con el segmento sensor del voltaje (S4) y el porción que conforma el poro del canal (P).

5.2. Implicación de los canales K_v en la patología de la HP.

La activación de los canales K_v determina un aumento del flujo de salida de K^+ , hiperpolarización de la membrana, cierre de los canales de

Ca^{2+} activados por voltaje, disminución de la entrada de Ca^{2+} y vasodilatación. Por el contrario la inhibición de los canales K_V produce despolarización de la membrana, apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L, aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y vasoconstricción (figura I-5). Además, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ induce proliferación de músculo liso (Moudgil *et al.*, 2006) e inhibición de la apoptosis (Platoshyn *et al.*, 2006), por lo que los canales K_V desempeñan también un papel importante en el remodelado vascular (Remillard y Yuan, 2004). Asimismo, los canales K_V constituyen la diana de mediadores vasoactivos implicados en la HP, siendo activados por el NO (Yuan *et al.* 1996) e inhibidos por la ET-1 (Salter *et al.*, 1998; Shimoda *et al.*, 1998), el TXA_2 (Cogolludo *et al.*, 2003), la angiotensina II (AT-II) (Hayabuchi *et al.*, 2001), la serotonina (Cogolludo *et al.*, 2006^a, Cogolludo y Pérez-Vizcaíno, 2010), el ácido araquidónico (Smirnov y Aaronson, 1996) o la hipoxia (Coppock *et al.*, 2001). En concreto, las subunidades $\text{K}_\text{V}1.5$ y $\text{K}_\text{V}2.1$ parecen desempeñar un papel importante en las AP y la HP. Ambas subunidades están implicadas en la vasoconstricción pulmonar hipóxica (Archer *et al.*, 1993). Por otro lado, la expresión y función de $\text{K}_\text{V}1.5$ está disminuida en las AP de pacientes con HP (Yuan *et al.*, 1998), y la expresión de ambas subunidades $\text{K}_\text{V}1.5$ y $\text{K}_\text{V}2.1$ está reducida en el modelo de HP inducido por hipoxia (Michelakis *et al.*, 2002b). Igualmente, los fármacos anorexigénicos o las ROS inhiben $\text{K}_\text{V}1.5$ y $\text{K}_\text{V}2.1$ (Weir *et al.*, 1996; Olschewski *et al.*, 2004; Cogolludo *et al.*, 2006). Finalmente, los fármacos activadores de canales K_V (dicloroacetato) o la inserción genética de $\text{K}_\text{V}1.5$ previenen o revierten el remodelado vascular en modelos animales de HP (Pozeg *et al.*, 2003; Michelakis *et al.*, 2002b; McMurtry., *et al.* 2004).

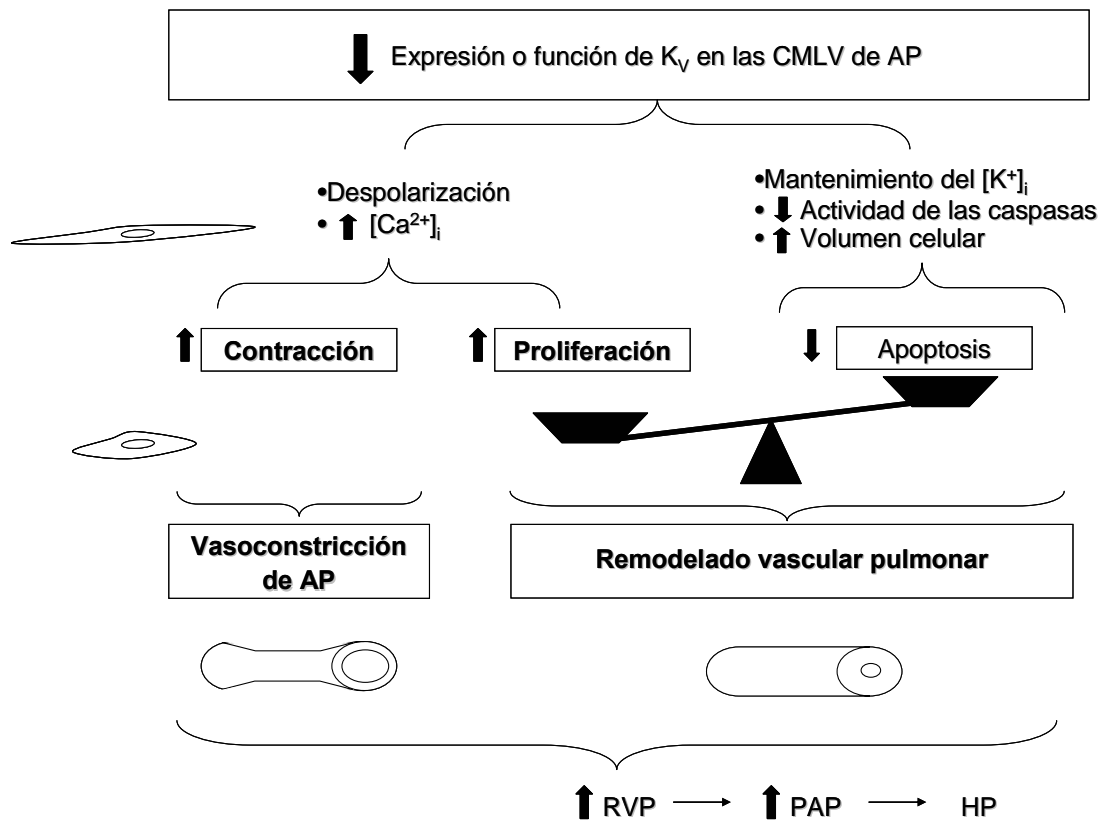


Figura I-5. Representación esquemática de la implicación de la disminución de la función o expresión de los canales K_v en el inicio y la progresión de la HP. Modificado de Burg et al., 2008 (RVP, resistencia vascular pulmonar; PAP, presión arterial pulmonar; HP, hipertensión pulmonar).

6. LA RELACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS CON LA HP.

Las proteínas morfogenéticas óseas (*Bone morphogenetic proteins*, BMP) pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (*Transforming growth factor β* , TGF- β). Las BMP regulan varios procesos incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de diferentes tipos celulares. Asimismo, desempeñan un papel vital en la embriogénesis y en el desarrollo vascular (Massague y Chen, 2000; Morrell *et al.*, 2006). Fueron identificadas inicialmente como moléculas reguladoras del crecimiento y diferenciación ósea y cartilaginosa, aunque en la actualidad sabemos que son citoquinas multifuncionales con actividad biológica en gran variedad de tipos celulares, incluyendo las CMLV y las células endoteliales (Kawabata *et al.*, 1998; Miyazono *et al.*, 2010; Gangopahyay *et al.*, 2011).

6.1. Señalización intracelular de BMP.

De forma similar a otros miembros de la familia del TGF- β , las BMPs desencadenan su señal de transducción a través de dos receptores de membrana del tipo serina-treonina kinasa que son el receptor de BMP de tipo 1 (ALK-3/BMPR1A, ALK-6/BMPR1B o ALK-2/ActR-IA) y de tipo 2 (BMPR2, ActR-IIa y ActR-IIb) (Massague y Chen, 2000, Machado *et al.*, 2009), que se ensamblan para formar homo y heterodímeros. Aunque ActR-IIa y ActR-IIb pueden ser activados por las BMP y comenzar las señales intracelulares en cooperación con BMPR1, es BMPR2 el receptor tipo 2 predominante en la señalización de BMP en condiciones fisiológicas (Yu., *et al* 2005). Los ligandos principales identificados para BMPR2 son BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF5 (factor de crecimiento y diferenciación) y GDF6. El BMPR2 es un receptor activo de forma constitutiva que, tras la unión del ligando, forma un complejo con el BMPR1 y fosforila un dominio rico en serinas y treoninas situado en la porción proximal del receptor BMPR1. La activación del dominio

catalítico serina/treonina kinasa de este receptor, inicia la cascada de señalización intracelular a través de la fosforilación de las Smad activadas por receptor (R-Smad o Smad1/5/8) que hasta su activación permanecen unidas a proteínas de membrana tipo anchorinas (p.ej: endofina, CD44). Las R-Smad fosforiladas forman a su vez un dímero con otra proteína (Co-Smad o Smad4) y este complejo de señalización es translocado al interior del núcleo donde regula la transcripción de genes que codifican para proteínas con acciones pro-apoptóticas y anti-proliferativas (figura I-6) (Heldin *et al.*, 1997; Massague y Chen, 2000). Existen también otras vías de señalización activadas por BMP que son independientes de Smad, y que actúan a través de la activación de MAP kinasas, PI3K/AKT, PKC y Rho-GTPasas (Miyazono *et al.*, 2010). De hecho, se ha comprobado que la señalización por BMP puede activar a p38-MAPK y ERK (Yang *et al.*, 2005; Nohe *et al.*, 2002). La activación de cada una de las diferentes vías de señalización depende tanto del ligando activador, como del tipo de receptor activado o su dimerización. Así, la activación de dímeros de BMPR1 y BMPR2 estimula la vía de las Smad, mientras que la activación de homodímeros de BMPR1 con el posterior reclutamiento de BMPR2 da lugar a la activación de la vía de las MAPK (Nohe *et al.*, 2002). Además de las R-Smad y co-Smads, se han identificado en humanos otras proteínas Smad con función inhibitoria (I-Smad o Smad 6 y 7). Las Smad inhibitorias compiten con co-Smad por la unión a Smad 1, mediando de esta forma un mecanismo regulatorio de la señal (Massague and Chen, 2000). Asimismo, existe un pseudoreceptor relacionado estructuralmente con BMPR1 (BAMBI), capaz de secuestrar a BMPR1 y a BMPR2 impidiendo la activación de la señalización intracelular. Adicionalmente, las funciones de los receptores tipo 1 y tipo 2 pueden estar sometidos a regulación por ubiquitinación y defosforilación (Miyazono *et al.*, 2010). En resumen, los efectos de los miembros de la familia del TGF- β son complejos y dependen del tipo celular, de los receptores activados, de los mecanismos de señalización intracelulares y los programas

transcripcionales que se activen en cada situación. (Schulick et al., 1998).

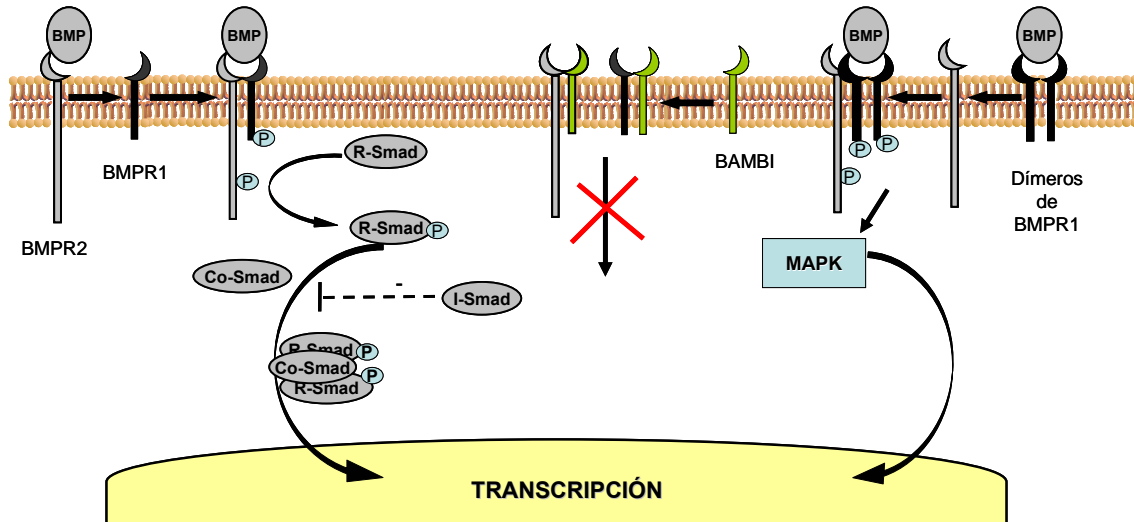


Figura I-6. Señalización intracelular dependiente de Smad e independiente de Smad (MAPK) desencadenada por la activación de los receptores de BMP, que estimula la transcripción génica en el núcleo. A su vez, la señalización de BMP está regulada a través de I-Smad y el pseudoreceptor BAMBI.

6.2. Implicación de BMPR en la patología de la HP.

Alteraciones o mutaciones en los receptores de la familia TGF- β se han asociado a enfermedades en las que la proliferación celular está descontrolada, como por ejemplo en cáncer, alteraciones esqueléticas, arteriosclerosis e HP (Miyazono et al., 2010). Aunque se han descrito diversas mutaciones en los receptores TGF- β asociadas a diferentes enfermedades, las mutaciones en BMPR2 sólo se han asociado con la HP. Más del 60% de los pacientes con HP heredable y ~20% de los pacientes con HP idiopática tienen mutaciones en el gen de BMPR2 (Machado et al., 2001). Además, mutaciones en el gen de BMPR2 que impiden la expresión de dicho receptor, son letales durante las primeras

etapas de la embriogénesis cuando se presentan en homocigosis (Beppu *et al.*, 2000), mientras que ratones con déficit de Smad5 mueren como consecuencia de un fallo en la angiogénesis (Yang *et al.*, 1999). Por otro lado, la activación de BMPR2 promueve la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales de AP, y participa en la activación de la eNOS (Gangopahyay *et al.*, 2011). Las proteínas BMP inhiben la proliferación y estimulan la apoptosis de las CMLV de AP de individuos sanos (Morrel *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Sin embargo, BMP-2 y BMP-7 generan proliferación en las CMLV de AP de pacientes con HP (Takeda *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha visto que los ratones deficientes para BMPR2 (BMPR2^{+/-}) tienen una mayor respuesta contráctil de las AP a 5-HT (Long *et al.*, 2006), así como las mutaciones o disminución en la expresión de BMPR2 parecen determinar un aumento del estrés oxidativo en humanos, animales y células en cultivo (Lane *et al.*, 2011). Además, la disminución de la expresión de BMPR2 o BMPR1 se observa en la HP secundaria en humanos y modelos animales (Atkinsnson *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2006; Du L. *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2011). En conjunto estos hechos han dado consistencia a la hipótesis de BMP, en la que el fallo o la deficiencia en los efectos supresores sobre CMLV y protectores sobre las células endoteliales, trae asociado procesos proliferativos y de remodelado (Chan y Loscalzo, 2008).

En conclusión, el gran número de evidencias de desarrollo de HP idiopática o secundaria en pacientes con mutaciones o deficiencia de BMPR1 o BMPR2, hacen que las alteraciones en BMPR sean consideradas uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de HP (Deng *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001).

7. LA HIPOXIA Y LA HP.

En el contexto de esta Tesis Doctoral se entiende por hipoxia a aquella condición en la que la presión parcial de O₂ atmosférico cae por debajo de 160 mmHg (<21% de O₂). Las respuestas vasculares ante la hipoxia difieren entre las arterias sistémicas y las pulmonares. Mientras las arterias sistémicas sufren vasodilatación, las arterias pulmonares responden con una vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Como se ha mencionado al principio de esta introducción, la VPH es un mecanismo fisiológico que permite derivar el flujo sanguíneo de zonas poco ventiladas a zonas mejor ventiladas, mejorando el acoplamiento de ventilación-perfusión. La hipoxia es capaz de inducir contracción de AP sin endotelio y CMLV de AP (Yuan *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1990), lo que indica que es una propiedad intrínseca de las CMLV de AP en respuesta a la hipoxia alveolar.

7.1. La vasoconstricción pulmonar hipóxica.

A pesar de las investigaciones realizadas, el mecanismo de la VPH sigue siendo controvertido en la actualidad. En general, existe un consenso acerca de la participación de unos sensores del estado redox celular (mitocondria, NADPH oxidasa), unos mediadores en la señalización (ROS) que regulan la actividad de los efectores finales, entre los que se encuentran diferentes canales de potasio, canales de calcio de entrada capacitativa y proteínas implicadas en la sensibilización al calcio (Yuan *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 2000; Waypa *et al.*, 2001; Waypa y Schumacker, 2005; Weissman *et al.*, 2006; Gurney y Joshi, 2006; Cogolludo *et al.*, 2009; Perez-Vizcaino *et al.*, 2010; Sylvester *et al.*, 2012). A lo largo de los últimos años nuestro grupo ha elaborado y confirmado una novedosa vía de señalización que completa los conocimientos existentes sobre la VPH. En ella se establece a la esfingomielinasa neutra (nSMasa) como mediador redox en las CMLV de AP, que en condiciones de hipoxia aguda media la producción de

ceramida a partir de la esfingomielina de la membrana. A su vez la ceramida es capaz de activar la PKC ζ que se encarga de la fosforilación de la subunidad reguladora p47^{phox} y por tanto de la activación de la NADPH oxidasa y la producción de ROS. Este hecho determina el cierre de los canales K_v, la despolarización de las CMLV, la apertura de los canales de Ca²⁺ voltaje dependiente y la contracción de las AP (figura I-7) (Cogolludo *et al.*, 2009; Frazziano *et al.*, 2011).

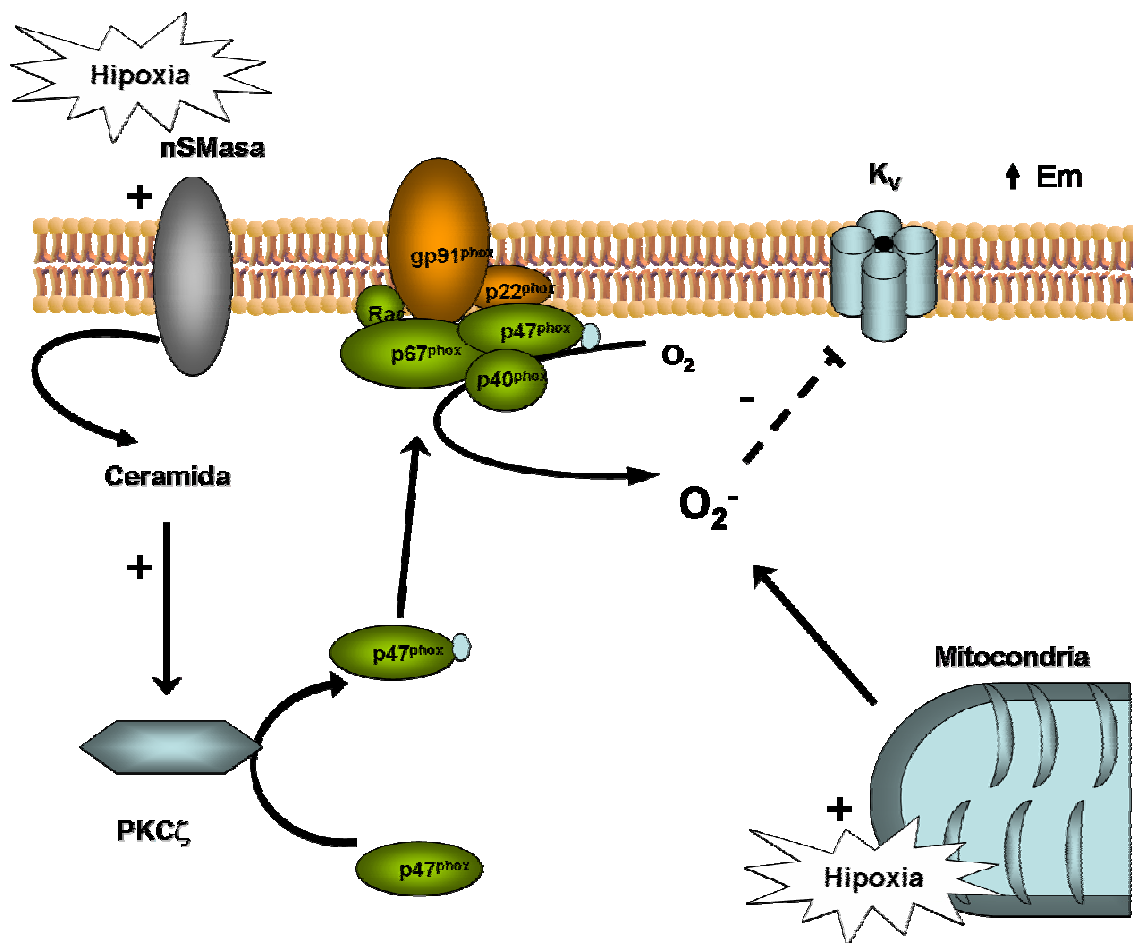


Figura I-7. Vía de la vasoconstricción pulmonar hipóxica mediada por la activación de la esfingomielinasa neutra (nSMasa).

7.2. Contribución de la hipoxia a la patogénesis de la HP.

En la exposición a elevada altitud o en enfermedades pulmonares como la atelectasia, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la apnea

del sueño, existe una hipoxia alveolar generalizada que induce una VPH, que puede dar lugar al desarrollo de HP y fallo ventricular derecho. Por otro lado, en enfermedades como el síndrome de distrés respiratorio, neumonía, sépsis o cirrosis hepática, la VPH es deficiente lo que conduce a un mal acoplamiento de la ventilación-perfusión y finalmente a una hipoxia generalizada o hipoxemia. Además, se ha demostrado que la exposición a hipoxia modifica la producción de ROS actuando sobre sus fuentes productoras (Archer *et al.*, 1993; Aaronson *et al.*, 2006; Frazziano *et al.*, 2011) y sobre la maquinaria antioxidante (Bonnet *et al.*, 2006; Bowers *et al.*, 2004). La hipoxia actúa estabilizando y aumentando la expresión del factor de transcripción inducido por hipoxia (*hypoxic-inducible factor- α* , HIF- α) que en condiciones de normoxia tiene una vida media corta. El HIF es el encargado de regular la expresión de la mayoría de los genes implicados en la respuesta fisiológica y patológica a la hipoxia (Tuder *et al.*, 2007). Igualmente, en estados de hipoxia prolongados aumenta la expresión de ET-1, del transportador de 5-HT, disminuye la expresión y actividad de los canales de potasio, aumenta la liberación de factores de crecimiento, 5-HT y TXA₂, aumenta el calcio intracelular y se activan mecanismos de sensibilización al calcio. En definitiva, la exposición aguda a hipoxia produce despolarización de las CMLV y vasoconstricción de AP, mientras que la hipoxia crónica tiene efectos antiapoptóticos, proliferativos y migratorios que dan lugar al remodelado vascular inducido por hipoxia (Sylvester *et al.*, 2012; Faller, 1999; Callebert *et al.*, 2006; Olchewski *et al.*, 2002; Humbert *et al.*, 2004; Chan y Loscalzo, 2008; Shimoda y Polak, 2011).

8. LA DIABETES MELLITUS

La glucosa es la principal fuente de energía celular. En condiciones fisiológicas sus niveles plasmáticos están estrechamente regulados por dos hormonas, el glucagón y la insulina. La insulina es una hormona polipeptídica generada por las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos, y sus efectos determinan una disminución de la glucemia y un aumento del metabolismo anabólico celular.

Se define como Diabetes mellitus (DM) a un amplio grupo de enfermedades metabólicas, caracterizadas por hiperglucemia y defectos en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas. Además, todas ellas comparten defectos en la secreción de la insulina y/o en la acción de la insulina. Se distinguen 4 tipos de DM: (1) la DM tipo 1 o dependiente de insulina, (2) la DM tipo 2 o no dependiente de insulina, (3), DM gestacional y (4) un grupo general que abarca otras DM causadas por alteraciones genéticas en diversos factores de transcripción que intervienen en el desarrollo embrionario (*Maturity Onset Diabetes of the Young*, MODY), por enfermedades pancreáticas, por infecciones, por tratamientos farmacológicos o asociada a otros síndromes.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la actualidad hay aproximadamente 346 millones de personas con DM, un 5 % de la población mundial, de los cuales un 10 % tiene DM tipo 1 y un 90 % DM tipo 2 (Creager *et al.*, 2003). Esta incidencia de la DM tipo 2 aumentará aún más en los próximos años como consecuencia del aumento de estilos de vida que favorecen la obesidad (Mokdad *et al.*, 2001a y 2001b).

8.1. Diabetes mellitus tipo 1.

La DM tipo 1 se caracteriza por la ausencia de secreción de insulina con elevados niveles de glucagón, es por ello que también puede ser denominada como DM dependiente de insulina. Las causas que la

originan son complejas, pero pueden ser explicadas por la participación conjunta de una predisposición genética y de factores ambientales, que en un 90% de los casos, resultan en una respuesta autoinmune y destrucción de las células β pancreáticas. En la muerte de las células β participan las moléculas oxidantes derivadas del óxido nítrico y los efectos citotóxicos directos de las células T CD8+. La destrucción de los islotes es mediada por autoanticuerpos y linfocitos T, aunque estos segundos parecen desempeñar un papel más importante ya que la transferencia de anticuerpos no es capaz de reproducir la destrucción de células β en animales. Entre las moléculas descritas responsables de los procesos autoinmunitarios de la diabetes se encuentran la insulina, la descarboxilasa de ácido glutámico, la sintasa del ácido γ -aminobutírico, las fosfatasas de tirosina ICA-512/IA-2 y la fgrina (proteína relacionada con los gránulos secretores de insulina). Sin embargo, sólo la insulina es exclusiva de las células β pancreáticas. El inicio de la enfermedad se establece frecuentemente durante la infancia o la juventud, pero puede ser desarrollada también durante la etapa adulta (Harrison, 2009).

8.2. Diabetes mellitus tipo 2.

La DM tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la acción de la insulina en combinación con una secreción alterada de la misma, aumento de la gluconeogénesis hepática y un metabolismo lipídico alterado. A diferencia de la DM tipo 1, en la DM tipo 2 existe una sobreproducción de insulina que puede compensar, al menos temporalmente, la resistencia periférica a los efectos de la insulina, por lo que también se ha denominado DM independiente de insulina. En la DM de tipo 2, la resistencia hepática a la insulina da lugar a una incapacidad de suprimir la gluconeogénesis, lo que produce hiperglucemia en ayunas y disminución del almacenamiento de glucosa en el hígado en el periodo posprandial. El aumento de la producción hepática de glucosa ocurre en una fase temprana de la evolución de la

diabetes. Como resultado de la resistencia a la insulina en tejido adiposo y la obesidad, el flujo de ácidos grasos libres desde los adipocitos aumenta y ello hace que se incremente la síntesis de triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad (LDL y VLDL) y que disminuya los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL y VHDL) que da lugar a la dislipidemia característica de la DM tipo 2. Clásicamente ha sido considerada de aparición durante la etapa adulta. Sin embargo, los factores que están asociados a su desarrollo (obesidad, inactividad física, dieta hipercalórica) son cada vez más comunes entre los jóvenes, por lo que en la actualidad también puede darse a edades tempranas (Harrison, 2009; Mokdad *et al.*, 2001a y 2001b).

8.3. Diabetes mellitus y la patología cardiovascular sistémica.

La diabetes constituye el principal factor de riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular (Beckman *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 1994; Luscher *et al.*, 2003). De hecho, se ha relacionado la duración y gravedad de la diabetes con la incidencia de enfermedad vascular (Jude *et al.*, 2001). Asimismo, las alteraciones cardiovasculares son la principal causa de muerte entre los pacientes con diabetes (Thomas *et al.*, 2003). Entre las alteraciones macrovasculares se encuentran la aterosclerosis y la calcificación de la capa media, mientras que las alteraciones microvasculares abarcan la retinopatía y la nefropatía, siendo éstas últimas las principales causas de ceguera y fallo renal, respectivamente (Creager *et al.*, 2003). Las alteraciones vasculares y la mayor incidencia de hipertensión en pacientes diabéticos aumentan el riesgo de sufrir infarto de miocardio, accidentes cerebro vasculares, así como procesos isquémicos en las extremidades que terminan en amputación del miembro (Abbott *et al.*, 1990; Beckman *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003). Además, la patología vascular diabética se ha asociado con el desarrollo de demencia y la enfermedad de Alzheimer (Luchsinger *et al.*, 2001).

El tono vascular en la diabetes está caracterizado por un aumento de la actividad de agentes vasoconstrictores, como la angiotensina II o la ET, y una disminución de la vasodilatación dependiente de endotelio (Klein *et al.*, 1996; Rodríguez-Mañas *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2007). Asimismo, la diabetes disminuye la disponibilidad de NO debido a la deficiencia de insulina o al defecto en la señalización de la insulina en las células endoteliales (Brownlee, 2001 y 2005). Además, en la diabetes se produce un aumento de la permeabilidad capilar que genera extravasación y depósitos proteicos, que junto a la sobreproducción de matriz extracelular inducida por factores de crecimiento como el TGF- β , dan lugar a una obstrucción capilar progresiva (Brownlee, 2001; Creager *et al.*, 2003). Por otro lado, los daños en la capa endotelial aumentan las alteraciones tromboembólicas y favorecen la aterosclerosis y sus complicaciones (Creager *et al.*, 2003; Frisbee, 2005). En la diabetes, el aumento mantenido de glucemia induce un estado proinflamatorio crónico que contribuye a la disfunción endotelial, alterando la expresión de genes importantes para la homeostasis vascular y aumentando la producción de ROS (Nacci *et al.*, 2009; Cohen y Tong, 2010; Jay *et al.*, 2006; Dokken *et al.*, 2008, Giacco y Brownlee, 2010).

8.4. Mecanismos moleculares del daño vascular en la patología diabética.

Se ha señalado a la hiperglucemia y a la hiperinsulinemia como elementos clave en el desarrollo de alteraciones asociadas a la patología diabética.

8.4.1. La hiperglucemia. La hiperglucemia generada en la diabetes afecta principalmente a determinadas células directamente relacionadas con la patología diabética, como son las células mesangiales, las neuronas, la microglia y las células endoteliales (Naudi *et al.*, 2012). Se

ha descrito que la hiperglucemia desarrolla sus efectos patológicos a través de 4 mecanismos (figura I-7) (Brownlee, 2001 y 2005):

1) Aumento de la vía del poliol. La aldosa reductasa es la enzima encargada de reducir diferentes sustratos carbonílicos a sus respectivos azúcares alcohólicos. En el caso de la glucosa se reduce a sorbitol mediante el consumo de NADPH. Las principales alteraciones debidas a la activación de esta vía se deben principalmente a daños osmóticos, ya que el sorbitol no difunde fácilmente a través de la membrana. Sin embargo, esta vía parece tener más implicación en la neuropatía diabética que en la patología cardiovascular asociada a la diabetes.

2) La glicosilación de proteínas. La glicosilación no enzimática de proteínas da lugar a la formación de los denominados productos finales de glicosilación avanzada (*Advanced glycation end-products*, AGE). La glicosilación es debida principalmente a productos oxidados de la glucosa (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglucosona). La glicosilación de proteínas altera su función. Así, se producen interacciones anómalas entre células cuando se generan a nivel de la matriz extracelular, y a través de la unión a receptores específicos (RAGE), activan la producción de ROS y modifican la expresión génica a través de NF- κ B. Estos productos se han visto asociados con una disminución de la elasticidad de vasos de gran calibre, en el aumento de la permeabilidad capilar e infiltrados carotídeos (Huijberts *et al.*, 1993), aumento de la producción de citoquinas, factores de crecimiento, factores protrombóticos y proinflamatorios en macrófagos y células endoteliales (Schmidt *et al.*, 1995; Ramasamy *et al.*, 2011; Yamagishi *et al.*, 2011).

3) Activación de las proteínas kinasa C (PKC). En condiciones de hiperglucemia aumentan los niveles intracelulares de DAG, activando de este modo diferentes isoformas de las PKC (α , β , δ , ϵ). También se ha descrito una activación de PKC de forma indirecta a través de AGE y por un aumento de ROS. La activación de diferentes isoformas de PKC en

hiperglucemia da lugar a una disminución de la producción de NO y/o aumento de la actividad de endotelina, a la activación de NADPH oxidasa y a un aumento de la acumulación de proteínas de matriz en vasos de pequeño calibre, por aumento de la expresión de fibronectina, colágeno y TGF- β . Es por ello que la activación de las isoformas de PKC por hiperglucemia generan un desequilibrio en el tono vascular, un aumento de la permeabilidad vascular, disminución de la fibrinólisis y procesos proinflamatorios (Brownlee, 2001; Giacco y Brownlee, 2010; Wang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Vetri *et al.*, 2012).

4) Aumento de la vía de las hexosaminas. En esta vía la fructosa-6-fosfato es desviada de la glucólisis para dar lugar a UDP-N-acetilglucosamina, que a su vez se emplea en la modificación postranslacional de proteínas. Se ha descrito que la transferencia de un residuo de N-acetilglucosamina en la eNOS bloquea su activación por Akt. Asimismo, se ha descrito que estos residuos de N-acetilglucosamina reducen la expresión de SERCA en el retículo sarcoplásmico (Du *et al.*, 2001; Giacco y Brownlee, 2010).

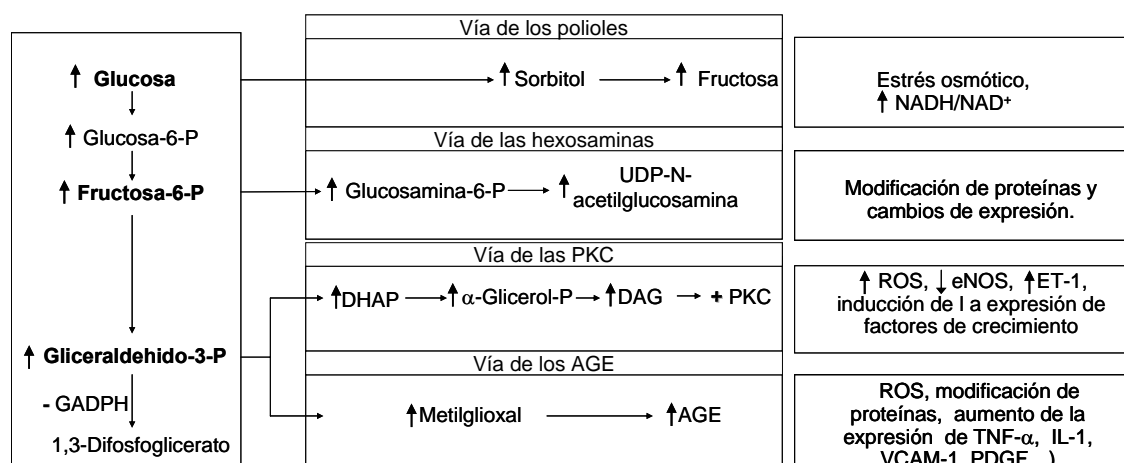


Figura I-8. Representación de las cuatro vías principales activadas por la hiperglucemia y algunas de las alteraciones celulares que inducen. GADPH, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa; DHAP; dihidroxiacetona fosfato; DAG, diacilglicerol; IL-1, interleucina 1; TNF- α , factor necrosante tumoral- α ; VCAM-1,

proteína de adhesión celular vacular 1; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (adaptado de Brownlee et al., 2001).

El hecho de que el estricto control de la glucemia en los pacientes diabéticos reduce, pero no suprime, el riesgo de accidente cardiovascular, sugiere que existe una progresión del daño vascular a pesar de la corrección de la hiperglucemia. A esto se le ha llamado memoria glucémica (Nathan *et al.*, 2005; Nielson y Lange, 2005; Muhlestein *et al.*, 2003; Ihnat *et al.*, 2007a y 2007b). Se ha atribuido esta memoria glucémica a los cambios epigenéticos y de expresión inducidos por ROS y AGE (Ihnat *et al.*, 2007a).

8.4.2. La resistencia la insulina. La resistencia a la insulina se da en los individuos con DM tipo 2 y en 2/3 de los pacientes considerados prediabéticos (Bonora *et al.*, 1998). En individuos sin obesidad y sin diabetes, la existencia de resistencia a la insulina está relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares independientemente de la existencia de otros factores de riesgo (Yip *et al.*, 1998; Rutter *et al.*, 2005). La resistencia a la insulina en adipocitos, aumenta la liberación de ácidos grasos desde los reservorios de triglicéridos. Del mismo modo, la ausencia de la señalización de la insulina en las células endoteliales lleva a un elevado metabolismo oxidativo de estos ácidos grasos libres, generando un aumento de las ROS mitocondriales y de las ROS generadas por la NADPH oxidasa (Du Y *et al.*, 2003; Du X *et al.*, 2006, Giacco y Brownlee, 2010; Meigs *et al.*, 2007). Asimismo, los ácidos grasos libres disminuyen la actividad de la sintasa de PGI₂, disminuyen la vasodilatación dependiente de eNOS y generan estímulos proinflamatorios (Steinberg y Baron, 1997; Du X *et al.*, 2006). Por otro lado, en la resistencia a la insulina existen unos niveles de BH₄ disminuidos, lo que lleva a un desacoplamiento de la eNOS, producción de ROS y a la disfunción endotelial (Shinozaki *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los propios ácidos grasos libres pueden inducir

resistencia a la insulina, generando de este modo una retroalimentación positiva (Boden et al., 1994). Igualmente se ha comprobado que la ET-1, cuyos niveles están aumentados en la diabetes, también es capaz de generar resistencia a la insulina (Jiang *et al.*, 1999).

8.5. La Diabetes mellitus y la patología pulmonar.

Los datos acerca de la influencia de la diabetes sobre la función pulmonar son variados y dispares. Por un lado existen estudios que describen una disminución del volumen pulmonar en pacientes diabéticos, mientras que en otros no se han encontrado cambios comparando con pacientes sanos (van den Borst *et al.*, 2010). El tejido pulmonar es rico en colágeno y elastina, ambos susceptibles de sufrir glicosilación no enzimática generando rigidez del parénquima pulmonar (Sandler, 1990). En estudios anatómicos post mortem en pacientes diabéticos se ha descrito un engrosamiento del epitelio alveolar y de la lámina basal de los capilares pulmonares (Vracko *et al.*, 1979). Se han observado restricciones en la ventilación, disminución de la capacidad de difusión gaseosa y de la capacidad vital pulmonar en pacientes diabéticos, y estas alteraciones presentan una relación inversamente proporcional a los niveles de hemoglobina glicosilada (Tiengo et al., 2008; Guvener et al., 2003; Niranja et al., 1997). Otros estudios han demostrado disfunción respiratoria en diabetes debida a alteraciones neuromusculares y diafragmáticas. Sin embargo, esta disfunción está asociada a las complicaciones neuropáticas diabéticas más que a alteraciones pulmonares propiamente dichas (Kabitzi *et al.*, 2008; Incalzi *et al.*, 2002).

Recientes estudios epidemiológicos han asociado a la diabetes con la hipertensión pulmonar. Así, los pacientes diabéticos presentan alteraciones plaquetarias y fibrinolíticas que generan un estado trombogénico y aumenta la prevalencia de tromboembolismo pulmonar e HP, independientemente de enfermedades coronarias, hipertensión, fallo cardíaco congestivo, consumo de tabaco o

hipertensión (Movahed *et al.*, 2005). Por otro lado, la resistencia a la insulina es más frecuente entre pacientes con HP que en la población en general. Además, los pacientes con resistencia a la insulina desarrollan una HP más grave y con una menor supervivencia, estableciendo a la resistencia a la insulina como un factor predictor de hospitalización por fallo cardíaco derecho (Zamanian *et al.*, 2009). Asimismo, una condición estrechamente asociada a la resistencia a la insulina y la diabetes como lo es la obesidad, podría contribuir al desarrollo de una HP más grave en pacientes genéticamente predispuestos (Taraseviciute y Voelkel, 2006). Se ha observado que la HP es más grave en pacientes con enfermedad obstructiva crónica (EPOC) y DM tipo 2 que en pacientes con sólo EPOC (Makarevich *et al.*, 2007). A nivel experimental, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha descrito una menor respuesta a agentes vasconstrictores de las AP de rata diabéticas tipo 1 sugiriendo una oposición de la diabetes tipo 1 al desarrollo de HP (Gurney y Howarth, 2009). Por otro lado se ha comprobado que ratones apoE^{-/-} con dieta alta en grasa, como modelo de resistencia a la insulina, desarrollan HP con una elevación de la presión sistólica ventricular derecha, hipertrofia del ventrículo derecho y remodelado arterial pulmonar, que se previene con el fármaco antidiabético rosiglitazona (Hansmann *et al.*, 2007).

A pesar de la extensa investigación de los efectos de la diabetes en diferentes órganos diana y en la vasculatura sistémica, poco se sabe de sus efectos a nivel pulmonar o de su relación con la HP.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

La HP es un síndrome caracterizado por una elevación mantenida en la presión arterial pulmonar media por encima de 25 mm Hg en reposo. Se trata de una enfermedad con una compleja fisiopatología y de etiología multifactorial. Se caracteriza por un aumento de la resistencia vascular pulmonar y vasoconstricción de las AP, una excesiva proliferación de las CMLV de las AP y remodelado vascular pulmonar, así como con procesos trombóticos a nivel pulmonar.

La diabetes es una enfermedad metabólica con repercusión multiorgánica, caracterizada por hiperglucemia y alteraciones en la producción y/o acción de la insulina. En la actualidad se calcula que afecta a un 5% de la población mundial y es considerada la pandemia del siglo XXI. Las alteraciones vasculares generadas por la diabetes han sido ampliamente estudiadas a nivel sistémico. Sin embargo, sus efectos a nivel pulmonar permanecen sin caracterizar. Recientemente se han publicado datos epidemiológicos que relacionan la diabetes con la HP, pero no se disponen de evidencias experimentales que apoyen la relación entre ambas patologías. Por ello, es necesario caracterizar las alteraciones pulmonares originadas por la diabetes a nivel pulmonar, así como profundizar en el estudio de aspectos funcionales, histológicos y moleculares que relacionen esta patología metabólica con la HP.

La **hipótesis** de esta Tesis Doctoral es que la diabetes mellitus podría ser un factor de riesgo que predispone y acelera el desarrollo de HP, induciendo de manera temprana las alteraciones funcionales, histológicas y moleculares características de la HP.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es la caracterización de las alteraciones pulmonares desarrolladas en la diabetes tipo 1 y en la

resistencia a la insulina, profundizando en el estudio de marcadores característicos de la HP con la intención de aportar evidencias experimentales que permitan determinar la posible relación entre la diabetes y la HP. El objetivo general se desglosa en los objetivos concretos que se detallan a continuación.

En la primera parte de esta Tesis Doctoral se planteó el estudio de los siguientes **objetivos concretos** en el modelo de diabetes tipo 1 inducido por estreptozotocina y en el modelo de resistencia a la insulina de ratas Zucker obesas:

1. Analizar la función endotelial en las AP, caracterizando la producción, disponibilidad y efectos de la vía del NO.
2. Estudiar la respuesta de las AP a vasoconstrictores asociados a la HP, profundizando en los mecanismos implicados en su respuesta.
3. Identificar cambios en los marcadores característicos de la HP como son la expresión de BMPR2, la densidad de las corrientes K_v en las CMLV de AP, la expresión de canales $K_v1.5$ y el remodelado vascular pulmonar.
4. Medir la PAP y cuantificar el grado de hipertrofia del VD.

En la segunda parte de la Tesis Doctoral desarrollamos unos **objetivos adicionales** derivados de los resultados previos. Generamos condiciones de diabetes tipo 1, de hipoxia moderada y su combinación para el estudio de los siguientes objetivos:

5. Analizar alteraciones tempranas de la HP como la función endotelial de las AP, el remodelado vascular pulmonar y los marcadores de HP (densidad de corriente K_v , BMPR2 y marcadores de inflamación pulmonar) comparando los cambios

en condiciones de diabetes, hipoxia moderada y en combinación de ambas condiciones.

6. Medir la PAP y analizar el remodelado cardiaco como valores determinantes del establecimiento de HP comparándolos en condiciones de diabetes, de hipoxia moderada y en combinación de ambas condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELOS.

Durante la realización de esta Tesis doctoral se dispuso de dos modelos comúnmente empleados en el estudio de la patología diabética, con el objetivo de analizar diferentes parámetros de función pulmonar bajo las condiciones que se detallan a continuación.

1.1. Modelo de diabetes tipo 1.

El modelo de diabetes tipo 1 se indujo tras una única inyección intraperitoneal de la toxina estreptozotocina (70 mg/Kg). La estreptozotocina es una metilnitrosourea que modifica las hexosas mediante la inserción de un grupo nitrosourea. Esta toxina produce daños específicos sobre células que expresan el receptor de glucosa de baja afinidad Glut2, principalmente células β -pancreáticas, hígado y riñón. Las células que captan las hexosas modificadas sufren alquilación del ADN, depleción de ATP y muerte por necrosis. Debido a su toxicidad sobre las células β -pancreáticas, se establece un estado de diabetes tipo 1 en el que la secreción de insulina se ve suprimida. En la primera parte del trabajo, que se realizó en colaboración con el grupo del Dr. López-López (Puebla, México) se emplearon ratas *Sprague-Dawley* macho (150-200g), aleatoriamente distribuidas en grupos control (salino) y diabético, seguidas durante 6 semanas o 4 meses. En estudios posteriores se trató con insulina glargina (5 unidades/kg, una vez al día) a ratas inyectadas con estreptozotocina seleccionadas aleatoriamente. Se confirmó la inducción de diabetes analizando los niveles de glucemia (>300 mg/dL) mediante un glucómetro *OneTouch Ultra*.

1.2. Modelo de resistencia a la insulina.

Para el estudio de la función de las arterias pulmonares en el modelo de diabetes tipo 2 se emplearon ratas Zucker obesas (fa/fa) de 17-18 semanas de edad, y su correspondiente grupo control (*Lean*) cedidas por la Dra. Dolores Prieto. El modelo de ratas Zucker presenta un cambio aminoacídico (Gln269Pro) en la región extracelular del receptor de leptina que resulta en una pérdida de función de dicho receptor. Como consecuencia se originan diferentes alteraciones entre las que cabe destacar hiperfagia, hiperplasia e hipertrofia de adipocitos, dislipemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Takaya *et al.*, 1996). Es un modelo empleado en el estudio de alteraciones asociadas a la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico.

1.3. Modelo de diabetes tipo 1 e hipoxia moderada.

En el posterior análisis de las alteraciones que se producen en condiciones de diabetes tipo 1 e hipoxia moderada, se emplearon ratas Wistar-Kyoto macho (250-300 g) divididas en grupos control y diabético. A las 4 semanas de la inyección con estreptozotocina, ratas aleatoriamente seleccionadas de ambos grupos fueron sometidas a condiciones de normoxia o de hipoxia moderada normobárica (14 ± 1 % de O₂) por un período adicional de 2 semanas (n=7 de cada grupo). Para ello, fueron introducidas en cámaras ventiladas con aire ambiental (normoxia) o con una mezcla de N₂ y aire ambiental (hipoxia). En ambas cámaras se colocó un adsorbente de CO₂ y se controlaron los niveles de O₂ mediante un electrodo (DrDAC oxygen sensor, Pico Technology).

Todos los procedimientos se realizaron conforme a la Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorios (NIH n° publicación 85-23, revisado 1996) y fueron aprobados por el Comité de experimentación animal de la U.C.M.

2. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL PULMONAR, SISTÉMICA Y VENTRICULAR DERECHA.

Los experimentos de medida de la presión arterial de Puebla (Méjico) se realizaron en ratas anestesiadas con pentobarbitona sódica 30-50 mg/kg mediante una inyección intraperitoneal y ventiladas con aire ambiental. La medida de la presión sistémica (PAS) sistólica y diastólica se realizó mediante la cateterización de un transductor por la arteria carótida derecha. La presión sistólica ventricular derecha (PSVD) se midió en ratas con el tórax abierto a través de un transductor cateterizado desde la vena yugular derecha, alcanzando el ventrículo derecho.

Para la medida de la presión arterial pulmonar en Madrid, se empleó como anestesia una mezcla de ketamina y xilacina (80 mg/kg y 8 mg/kg respectivamente) de aplicación intraperitoneal. Durante la operación las ratas se ventilaban con aire ambiental (volumen tidal de 9 mL/kg, 60 respiraciones/min, presión al final de la espiración [PEEP] 2 cm H₂O). Se obtuvieron medidas de la PSVD, de la presión arterial pulmonar sistólica, diastólica y media (PAPS, PAPD y PAPM respectivamente) mediante la cateterización a tórax abierto a través del ventrículo derecho hasta alcanzar la arteria pulmonar.

3. TEJIDOS.

Tras el sacrificio de las ratas se extrajeron los pulmones y el corazón, que fueron inmediatamente sumergidos y lavados en una solución fisiológica Krebs con una composición en mM de NaCl 118, KCl 4.75, CaCl₂ 2.0, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2 y glucosa 11. Algunos de los corazones fueron pesados y diseccionados al instante, para separar cuidadosamente el ventrículo derecho (VD) y el ventrículo izquierdo con el septo (VI+S). El cálculo del índice de Fulton, un indicador de hipertrofia del VD, se realizó según la ecuación $VD / (VI+S)$.

Los pulmones fueron diseccionados para extraer las arterias pulmonares de resistencia (0,3-0,5 mm de diámetro) y de conductancia (1-1,2 mm de diámetro).

Cada tejido fue procesado de forma diferente según la técnica para la que iba a ser empleado. En los sucesivos apartados de material y métodos se describirá con detalle el tratamiento y soluciones empleadas para el desarrollo de los experimentos con cada tejido.

4. HISTOLOGÍA.

Corazones. Los corazones fueron fijados con formol al 4% y embebidos en parafina para su posterior procesamiento en cortes de 1 mm de grosor. Los cortes fueron fotografiados y analizados mediante *imageJ* (versión 1.41, *National Institute of Health*, USA).

Arterias pulmonares (AP). Las AP sin fijar fueron incluidas en OCT, congeladas y cortadas transversalmente en rebanadas de 20 µm para su

posterior utilización en los experimentos de detección de la producción de superóxido y para los experimentos de detección de la subunidad p47^{phox} mediante inmunohistoquímica.

Pulmones. Sistemáticamente el pulmón derecho de cada animal se fijaba *in situ* por medio de una inyección de formol a través de la tráquea y, a continuación, se incluía en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes que fueron teñidos con hematoxilina/eosina y tricrómico de Masson para su análisis. Los cortes fueron analizados al microscopio donde la elastina fue identificada por su autofluorescencia. Las arterias de calibre entre 25-300 μm se analizaron y clasificaron en musculares, parcialmente musculares o no musculares bajo condiciones de ciego experimental según describieron Meyrick *et al.* (1978). El diámetro exterior a la lámina elástica y el diámetro interior a la lámina elástica fueron medidos usando el programa informático *ImageJ* (versión 1.41, *National Institute of Health*, USA). Se midieron 5-6 arterias con un diámetro externo entre 25-75 μm de cada animal. Se calculó el grosor de la capa media, el área transversal de la capa media y el área transversal total. Para determinar el remodelado vascular se calculó el grosor porcentual de la capa media (grosor de la capa media/ diámetro interno \times 100) y el área porcentual de la capa media (área transversal de la capa media/ área transversal total \times 100).

5. DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO (O_2^-).

Los cortes de AP descritos anteriormente fueron incubados en solución de Hepes con 4,6-diamidin-2-fenilindol diclorohidrato (DAPI, 0.3 μM), como tinción nuclear, y con dihidroetidio (DHE, 10 μM). El DHE penetra en las células donde es oxidado por O_2^- dando lugar a etidio, el cual se

intercala en el ADN dando una fluorescencia roja proporcional a la cantidad de O_2^- presente en la célula. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía con un filtro de excitación de 530 nm o 345 nm y uno de emisión de 610 nm o 455 nm para la medida de la fluorescencia de DHE y DAPI respectivamente. Tras un período de estabilización de 30 minutos, se llevó el control temporal de la fluorescencia de las arterias control y diabético a lo largo del cual se tomaron fotos de la fluorescencia de las muestras. Se empleó el programa *ImageJ* para la medida de la fluorescencia y la producción de O_2^- se expresó como la relación entre la fluorescencia emitida por DHE y DAPI.

6. INMUNOHISTOQUÍMICA.

6.1. Detección de p47^{phox} en AP.

Los cortes de AP fueron fijados con formol al 4% durante 20 minutos y se incubaron durante 1 hora con una solución tamponada de fosfatos (PBS 0.1 M), con albúmina bovina al 3% y detergente Triton X-100 al 0.1%, en cámaras humedecidas ubicadas en una estufa a 37°C. El objeto de este tratamiento es la permeabilización celular y el bloqueo de las uniones inespecíficas. A continuación, las preparaciones se incubaron con un anticuerpo primario capaz de reconocer la subunidad p47^{phox} de la NADPH oxidasa (anti-conejo, dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology), seguido de un lavado para eliminar el anticuerpo no fijado, un tratamiento final de 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con un fluoroforo (1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, Cambridgeshire, UK) y un lavado final. Se empleó un microscopio de fluorescencia (modelo Leica, DR IRB, Wetzlar, Alemania) conectado con una cámara digital de color Leica DC300F para la toma de fotos y el registro de fluorescencia. La medida de la expresión de p47^{phox} se realizó mediante el programa *ImageJ* y se

expresó como la relación entre la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario frente a la emitida por DAPI.

6.2. Detección de CD68 en pulmón

En este grupo de experimentos, los cortes de pulmón anteriormente descritos fueron desparafinados y rehidratados durante 20 minutos a 95°C, con un tampón de pH 6 compuesto por citrato sódico 10 mM y detergente Tween 20 al 0,05%. De forma similar a lo descrito para el apartado anterior, se bloquearon las uniones inespecíficas y se incubó con un anticuerpo anti-CD68 (ED1, 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se empleó el Kit comercial *InmunoCruz Mouse ABC Staining System*, que contiene una solución de bloqueo, un anticuerpo secundario de ratón, peroxidasa de rábano y el sustrato para la peroxidasa. Se realizó una tinción con hematoxilina que dio una coloración azul a los núcleos. A continuación, se expresó porcentualmente la cantidad de células marcadas con CD68 corregido por el número de núcleos marcados con hematoxilina usando el software *InmunoRatio* (Tuominen *et al*, 2010).

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Una de las técnicas empleadas en esta Tesis para el análisis de la expresión génica fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa tras una Transcripción Inversa (RT-PCR). Esta técnica de gran sensibilidad nos permite comparar entre distintos grupos experimentales los niveles de expresión de pequeñas cantidades de ARNm.

El aislamiento del ARN total a partir de AP de resistencia o pulmón de rata se realizó empleando el *kit RNeasy Mini* (Qiagen, Hilden, Germany).

El homogenado se centrifugó a 10.000g durante 5 minutos. El sobrenadante se mezcló con un volumen igual de etanol al 70% provocando la precipitación del ARN, el cual se retiene y purifica en las columnas proporcionadas en el kit siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Finalmente, el ARN se disuelve en agua libre de ARNasas y se mantiene a -80°C. La concentración del ARN purificado se mide mediante determinación espectrofotométrica a 260nm usando el equipo *NanoDrop3300* (Thermo scientific). El ADN codificante (ADNc) se obtuvo mediante transcripción inversa, siguiendo el protocolo del *kit iScript* de síntesis de ADNc (BioRad, Hemel Hempstead, UK). La PCR en tiempo real se realizó usando el sistema *Taqman* (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) en la unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, empleando cebadores sentido y antisentido específicos contra las secuencias de los productos que se citan a continuación (tabla M-1).

Tabla M-1. Secuencias de los cebadores empleados en esta Tesis Doctoral.

	Secuencia 5'-3'
Kv1.5	Sentido GGAAGAACAAGGCAACCAGA
	Antisentido AGCTGACCTTCCGTTGACC
iNOS	Sentido TTGGAGTTCACCCAGTTGTG
	Antisentido ACATCGAAGCGGCCATAG
eNOS	Sentido GGTATTTGATGCTCGGGACT
	Antisentido TGTGGTTACAGATGTAGGTGAACA
BMP2	Sentido CGGGCAGGATAAATCAGGA
	Antisentido CAGGAAAGTAAATTCGGGTGA
β -Actina	Sentido GCCCTAGACTTCGAGCAAGA
	Antisentido TCAGGCAGCTCATAGCTCTTC

Los datos fueron analizados con *ABI Prism 7700* versión 1.9 y los resultados se normalizaron respecto a los niveles de expresión del ARNm de la β -actina (gen control) expresándose como un porcentaje de los valores obtenidos en las muestras de ratas control.

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.

Para el análisis de la expresión proteica se usaron AP de resistencia o pulmones enteros que fueron homogenizados en una solución tamponada (HEPES 10 mM (pH 8), KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ditioneitol 1 mM), con un agente surfactante (NPY40 1%) y con una batería de inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina 40 μ g/ml, leupeptina 4 μ g/ml, p-tosil-L-lisina clorometilcetona sódica 4 μ g/ml, NaF 5 mM, Na₂ MoO₄ 10 mM, NaVO₄ 1 mM, fenilmetanosulfonil fluoruro 0.5 mM y ácido okadaico 10 nM). El extracto fue centrifugado, separando el sobrenadante sobre el cual se estimó la concentración proteica mediante el método de Lowry (*Mini protean assay kit*, Bio Rad). Las proteínas fueron separadas mediante el método SDS-PAGE en geles de acrilamida (7,5-12%) siguiendo el método de Laemmli en sistemas de mini-geles (Bio-Rad). Posteriormente, las proteínas se transferían a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) donde eran tratadas con una solución de leche libre de grasa al 5% para el bloqueo de uniones inespecíficas. A continuación, se incubaban durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo primario (tabla M-2), seguido de un tratamiento con un anticuerpo secundario (de conejo o de ratón) conjugado con peroxidasa de rábano.

Las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) y se cuantificaron utilizando un programa de análisis densitométrico de imagen (*Quantity One*, Bio-Rad

Laboratories). Los valores de cada banda de la proteína en estudio fueron corregidos por los valores obtenidos de la banda de una proteína control (actina) y expresados como porcentaje de los valores controles.

Tabla M-2. Características de los anticuerpos empleados en esta Tesis Doctoral.

Anticuerpo	Dilución-Secundario	Casa comercial
K _v 1.5	1:200-conejo	Alomone Labs
5-HT _{2A} R	1:250-ratón	BD Biosciences Pharmigen
COX-2	1:200-conejo	Cayman Chemical
SOD-1	1:1000-conejo	Stress-Gen
p47 ^{phox}	1:200-conejo	Santa Cruz Biotechnology
eNOS	1:2500- ratón	BD Biosciences Transductions
iNOS	1:5000- ratón	BD Biosciences Transductions
BMPR2	1:250- ratón	BD Biosciences Transductions
α-actina	1:10000- ratón	Sigma-Aldrich
β-actina	1:5000- ratón	Sigma-Aldrich

9. REACTIVIDAD VASCULAR.

9.1. Registro de contractilidad en AP de conductancia.

Para el registro de la contractilidad vascular se utilizaron baños de órganos (copas de Allhin) termostatizados a 37°C y equipados con un sistema de oxigenación. Los anillos de arterias se incubaron en solución Krebs preparada diariamente y burbujeada con carbógeno (95% O₂ - 5%CO₂), lo que permite mantener un pH de 7,4. Los anillos se montaron entre dos alambres en forma de “L”, uno de ellos sujeto al baño y el otro a un transductor de fuerza-desplazamiento acoplado a un amplificador de señal (Cibertec modelo PRE 2064) y a un ordenador. La contractilidad se registró usando un sistema de digitalización y análisis de señales (REGxPC de Cibertec, España). Los anillos se sometían a una tensión tal que permitiera alcanzar una respuesta contráctil óptima. Esta tensión basal óptima (350 mg) se determinó en ensayos preliminares. Las arterias se dejaron estabilizar durante 60-90 minutos, periodo durante el cual se lavaron las preparaciones cada 30 minutos con solución Krebs a 37°C, recuperando la tensión basal cuando era necesario.

9.2. Registro de contractilidad en AP de resistencia.

El análisis de las respuestas contráctiles de las AP de resistencia se realizó en miógrafos (modelo 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca). Cada arteria se sometió a una tensión correspondiente a su diámetro luminal óptimo, es decir, el diámetro al cual cada preparación desarrollaba su respuesta contráctil máxima a KCl (125 mM), utilizando un protocolo de diámetro-tensión que consiste en incrementar el diámetro luminal en intervalos de aproximadamente 50 µm y estimular el vaso en cada uno de los niveles de distensión con KCl 125 mM (Villamor et al., 2002).

10. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Para registrar las corrientes de potasio se utilizó la técnica del parche de membrana en su configuración de célula entera (*whole-cell patch-clamp*). Esta técnica desarrollada a principios de los ochenta (Hamill y cols., 1981), permite fijar el potencial de membrana de la célula y registrar las corrientes iónicas generadas al aplicar pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes. El fundamento de esta técnica consiste en formar un sello de alta resistencia entre una micropipeta de vidrio con un microelectrodo en su interior y la membrana de la célula. La micropipeta se llena con la solución interna cuya composición varía dependiendo de la corriente a estudiar. Al poner la pipeta sobre la superficie de la célula se aplica una presión negativa mediante una ligera succión de tal forma que la porción de la membrana localizada en la luz de la pipeta se invagina formando un sello de alta resistencia. A partir de este punto, para conseguir la configuración *whole cell* se aplica una succión adicional rompiendo la porción de la membrana invaginada. Tras la rotura del parche de la membrana entran en contacto la solución interna y el citoplasma celular cambiando inmediatamente la composición de este último. En estas condiciones se fija el potencial de membrana al potencial deseado y se registra la corriente generada a través de todos los canales presentes en la membrana (corriente macroscópica).

10.1. Aislamiento de células de músculo liso.

Las AP de resistencia fueron disecadas en una solución fisiológica carente de calcio de composición (en mmol/L) NaCl 130, KCl 5, MgCl₂ 1.2, glucosa 10, HEPES 10 (ajustado a pH 7.3 con NaOH). Tras haber

eliminado el endotelio la arteria es cortada longitudinalmente e incubada en una solución enzimática compuesta por (en mg/mL) papaína 1, ditiotritol 0,8 y albúmina 0,7. Tras un tratamiento a 4°C durante 4 minutos y a 37°C durante 6 minutos en dicha solución enzimática, se obtiene una suspensión de células con la que se realizan los experimentos dentro de un tiempo limitado a 8 horas máximo.

10.2. Registros de las corrientes iónicas.

Las corrientes de membrana se registraron usando un *Axopatch 200B* y una *Digidata 1322A* (Axon Instruments, Burlingame, CA, USA) a través de la técnica del *patch-clamp* en configuración de célula entera, anteriormente descrita. Las pipetas de patch se crearon a partir de capilares de cristal de borosilicato (GD-1, Narishige Scientific Instruments, Tokio, Japón) usando un estirador y pulidor de pipetas horizontal programable (Zeitz DMZ Puller, AutoMate Scientific). Las pipetas se rellenaron de una solución interna de características y composición similar al interior celular (en mmol/L: KCl 110, MgCl 2 1.2, Na 2 ATP 5, HEPES 10, EGTA 10). La resistencia de las pipetas en contacto con la solución externa fue de 2-4 M Ω . Los protocolos de voltaje y adquisición de datos se llevaron a cabo usando el software *pCLAMP 9.2* (Axon Instruments). La capacitancia celular se determinó mediante la integración del artefacto capacitativo transitorio, en respuesta a un pulso hiperpolarizante de -10 mV. Para el registro de las corrientes iónicas y del potencial de membrana se colocaron dos o tres gotas de la solución de células recién aisladas en un baño de 500 μ l sobre la platina de un microscopio invertido (modelo Leica). Tras un periodo de aproximadamente 15 minutos, tiempo necesario para que las células se adhirieran al fondo del baño, se perfundió con la solución salina fisiológica carente de calcio y se empezaron los experimentos. El potencial de membrana se midió en condiciones de fijación de corriente (*current-clamp*) ($I=0$, frecuencia de muestreo 500 Hz) y el ruido eléctrico

se disminuyó mediante una reducción de datos (usando el software *Clampfit 9.2*). Las corrientes K_v (IK_v) se registraron a potenciales entre +60 mV y -60 mV, desde un potencial de mantenimiento de -60 mV y aplicándose pulsos despolarizantes de 200 ms en incrementos de 10 mV (*protocolo IV*). Las corrientes se midieron al final del pulso y se normalizaron con la capacitancia de la célula, expresándose en pA/pF (Cogolludo *et al.*, 2003 y 2006).

Una vez abierto el sello se aplicaba una secuencia de pulsos de 200 ms de duración a 30 mV cada 10 segundos durante 3 minutos (*protocolo de steps*), hasta que la corriente generada era estable, y seguidamente se aplicaba un protocolo IV. En aquellos experimentos en los que se estudiaron los efectos agudos de la hipoxia sobre las corrientes, se realizaron dos protocolos de *steps* seguidos de un protocolo IV en cada una de las condiciones (normoxia e hipoxia).

11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA.

Los homogenizados de pulmón fueron sometidos a tres ciclos de congelación y descongelación seguidos de una centrifugación para obtener el sobrenadante. La medida de la actividad mieloperoxidasa se realizó por espectrofotometría en triplicados de 10 μ l de muestra mezclados con 90 μ l del tampón de reacción (tampón fosfato potásico 50 mM, O-dianisidina dihidrocloruro 0.167 mg/ml, y H_2O_2 0.0006%). La lectura de las medidas se realizó a 460 nm a lo largo de 6 minutos en un espectrofotómetro de placas. Los valores obtenidos fueron normalizados por los mg de proteína de cada muestra cuantificados por el método de Lowry.

12. FÁRMACOS EMPLEADOS.

Tabla M-3. Fármacos empleados en esta Tesis Doctoral.

FÁRMACO	ACCIÓN
Fenilefrina	Agonista α adrenérgico.
Acetilcolina (ACh)	Agonista de receptores colinérgicos.
Serotonina (5-HT)	Agonista de receptores serotoninérgicos.
Nitroprusiato sódico (NPS)	Donador de NO. Vasodilatador independiente de endotelio.
L-NAME (<i>L</i> -nitroarginina-metil-ester)	Inhibidor no selectivo de las enzimas óxido nítrico sintasas. (NOS).
Superóxido dismutasa (SOD)	Enzima antioxidante que cataliza la dismutación de superóxido, produciendo H_2O_2 .
Apocinina	Inhibidor de la NADPH oxidasa.
Ketanserina	Antagonista de los receptores 5-HT _{2A} .
α - metil-5-HT	Agonista de los receptores 5-HT ₂ .
Indometacina	Inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX).
NS398 (<i>N</i> -[2-(ciclohexiloxi)-4-nitrofenil]-metanosulfonamida)	Inhibidor de la COX-2.

U46619 (<i>9,11-dideoxi-11α,9α-epoximetanoprostaglandina F_{2a}</i>)	Agonista de los receptores de IP.
1400W (<i>dihidrocloreuro de N-[[3-(aminometil)fenil]metil]-etanimidamida</i>)	Inhibidor selectivo de la NOS inducible.
Pirogalol (<i>1,2,3-trihidroxibenceno</i>)	Donador de aniones superóxido.

Todos los fármacos y reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich, a excepción de 1400W y NS398 obtenidos de los laboratorios Calbiochem, y U46619 de Merck Biosciences. Los fármacos fueron adecuadamente disueltos según su polaridad, siguiendo las recomendaciones de la ficha técnica de seguridad facilitadas por cada distribuidor.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) para un determinado número de anillos de arterias pulmonares o células (n) de distintos animales. Las curvas concentración respuesta se ajustaron individualmente a una ecuación logarítmica. De cada experimento se calculó el efecto máximo (E_{\max}), la concentración efectiva 50 (EC_{50}) y el logaritmo molar negativo de la EC_{50} (pD_2). La potencia antagonista de la ketanserina (pK_B) se calculó según la ecuación indicada a continuación, donde DR es la relación de la media de las EC_{50} de 5-HT en presencia y en ausencia de una concentración determinada de ketanserina ($[B]$).

$$pK_B = \log(DR - 1) - \log[B]$$

Los resultados experimentales se analizaron comparando las medias mediante la prueba t de Student para muestras pareadas, no pareadas

o el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Dunnet para observaciones múltiples. El análisis de la distribución de las AP en musculares, parcialmente musculares y no musculares, se realizó con la prueba χ^2 . Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que $P < 0.05$.

RESULTADOS

**1. ESTUDIO DE LA CONTRACTILIDAD DE AP, FUNCIÓN
ENDOTELIAL Y MARCADORES DE HP EN EL MODELO DE
DIABETES TIPO 1.**

1.1. ESTUDIO DE LA CONTRACTILIDAD DE AP EN EL MODELO DE DIABETES TIPO 1.

Los anillos de AP de conductancia de ratas control y diabéticas fueron estimulados con KCl 80 mM para obtener una contracción sobre la que se compara las sucesivas respuestas vasoconstrictoras y que sirve de referencia de la capacidad contráctil de las arterias. No se encontraron diferencias en la respuesta contráctil a KCl entre AP procedentes de ratas controles y diabéticas (374 ± 14 y 373 ± 94 mg, respectivamente). Sin embargo, la curva concentración respuesta al agonista de receptores α -adrenérgicos fenilefrina (figura R-1A), revela un mayor efecto máximo al agonista α en el grupo de ratas diabéticas respecto a las controles ($E_{\max} = 106 \pm 6$ vs $83 \pm 7\%$ de la respuesta a KCl, $n=5$ y 6 , respectivamente; $p \leq 0.05$). Por otro lado, no se vieron diferencias en la concentración de fenilefrina necesaria para alcanzar el 50% del efecto máximo (pD_2 $7,40 \pm 0,25$ vs $7,37 \pm 0,10$).

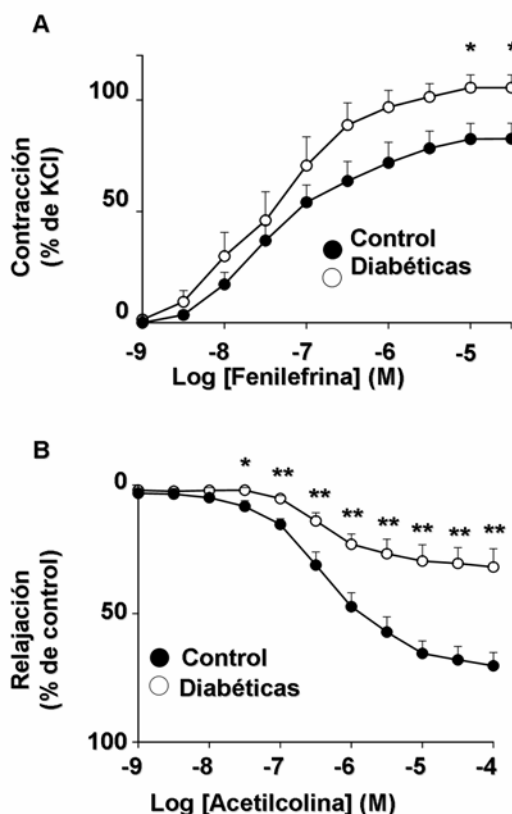


Figura R-1. La diabetes produce disfunción endotelial de AP. (A) Curva concentración respuesta a fenilefrina en AP de ratas control y diabéticas. (B) Respuesta vasodilatadora a Ach en AP contraídas con fenilefrina 10^{-7} M. Los resultados están expresado como las medias \pm e.e.m ($n=6$ controles y $n=5$ diabéticas en A y $n=13$ controles y $n=12$ diabéticas en B). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ respecto a los anillos de AP controles.

1.2. MEDIDA DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL MODELO DE DIABETES TIPO 1.

1.2.1. Respuesta a ACh.

La función endotelial se valoró analizando la respuesta de los anillos a concentraciones crecientes de acetilcolina (ACh) en anillos de AP que fueron previamente contraídos con fenilefrina 10^{-7} M de forma que alcanzase un 75% de la respuesta máxima a KCl. El análisis se realizó en un total de 12 ratas diabéticas y 13 controles. La respuesta máxima a ACh fue significativamente menor en AP de ratas diabéticas que en las controles (figura R-1B, E_{\max} 34 ± 6 vs 71 ± 5 % respectivamente, $P < 0,01$), mientras que la concentración necesaria para alcanzar el 50% de la relajación inducida por ACh no varió significativamente entre grupos ($pD_2 = 6,28 \pm 0,10$ vs $6,38 \pm 0,11$).

1.2.2. Contribución de la vía del NO.

Se comparó en ambos grupos la funcionalidad de la vía del NO a nivel de su producción y efectos. Para analizar el papel del NO en la relajación inducida por ACh los anillos fueron pretratados con un inhibidor no selectivo de NOS (L-NAME 10^{-4} M). En ambos grupos la respuesta a ACh fue inhibida de forma similar tras la incubación con L-NAME (figura R-2A). Sin embargo, la incubación con L-NAME produjo una contracción adicional en las AP de ratas controles que fue significativamente mayor que en las AP de ratas diabéticas (figura R-2B), lo que apunta a que en las AP de ratas control existe una producción basal de NO que es mínima en las AP de las ratas diabéticas. Así mismo, se realizó una curva concentración respuesta a un donador de NO (nitroprusiato sódico, NPS), el cual mimetiza los efectos del NO liberado por el endotelio produciendo una vasodilatación independiente de endotelio. La curva de respuesta a NPS no mostró

diferencias entre ambos grupos (figura R-2C) indicando una correcta funcionalidad del final de la vía del NO. Finalmente, la expresión de eNOS en homogenizados de pulmón, analizada por *western blot*, no reveló diferencias significativas entre ambos grupos (figura R-2D).

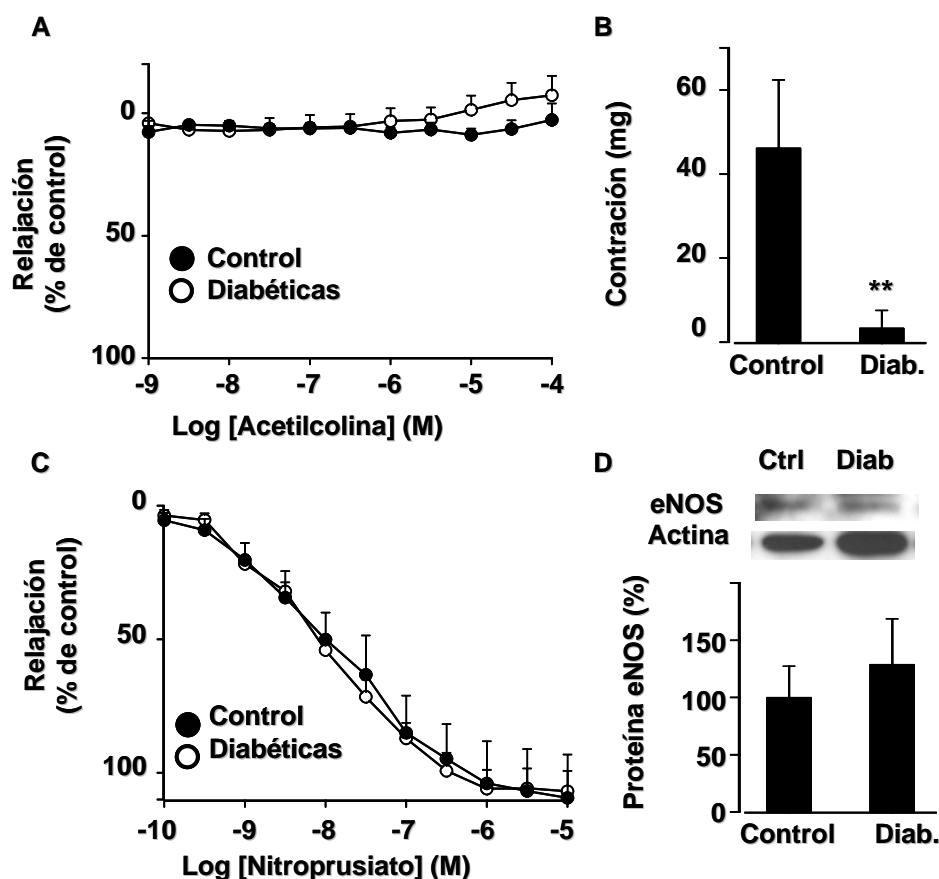


Figura R-2. Función de la vía del NO. (A) Efecto inhibitorio del inhibidor de NO sintasa L-NAME (10^{-4} M), sobre la relajación a ACh en AP controles y diabéticas precontraídas con fenilefrina (10^{-7} M). (B) Respuesta contráctil inducida por L-NAME (10^{-4} M). (C) Relajación endotelio independiente a NPS en AP precontraídas con fenilefrina (10^{-7} M). (D) Imagen representativa y gráfica de barras que muestra los valores densitométricos de la expresión proteica de eNOS en homogenizados de pulmón, normalizados por los de la β -actina y expresados como porcentaje de la expresión del grupo control. Los resultados están expresado como las medias \pm e.e.m ($n=7$ controles y $n=6$ diabéticas en A, B y C, y $n=6$ controles y $n=5$ diabéticas en D). ** $P<0.01$ respecto a los anillos de AP controles.

1.2.3. Participación del anión superóxido.

La intención de los siguientes experimentos fue analizar la participación de O_2^- en la disfunción endotelial de las AP de ratas diabéticas. El pretratamiento con SOD (100 U/mL) produjo un aumento de la relajación a ACh (figura R-3A), siendo este efecto más marcado en las AP de las ratas diabéticas. Como consecuencia del tratamiento, el efecto máximo de la curva a ACh no fue significativamente diferente entre el grupo control y diabético ($E_{max} = 91 \pm 5 \%$ y $83 \pm 4 \%$, respectivamente).

Una vez conocida la participación de O_2^- en la reducción de la respuesta a ACh, se caracterizó la producción y localización de dicho anión mediante inmunohistoquímica. Se realizaron cortes de AP de grupos control y diabético que fueron tratados con DHE. La fluorescencia roja derivada de DHE como indicativo de la producción de O_2^- , fue corregida por la fluorescencia emitida por el marcador nuclear DAPI. Los anillos de las ratas diabéticas presentaron mayor fluorescencia repartida a lo largo de las tres capas (adventicia, media y endotelial) que los cortes de AP controles (figura R-3B). De forma complementaria analizamos por *western blot* la expresión de la enzima SOD-1 en homogenizados de AP. Paradójicamente la expresión SOD-1 en las muestras de diabéticas fue significativamente mayor que en las controles (diabéticas $241 \pm 72 \%$ vs controles $100 \pm 5 \%$, $p \leq 0,05$, figura R-3C).

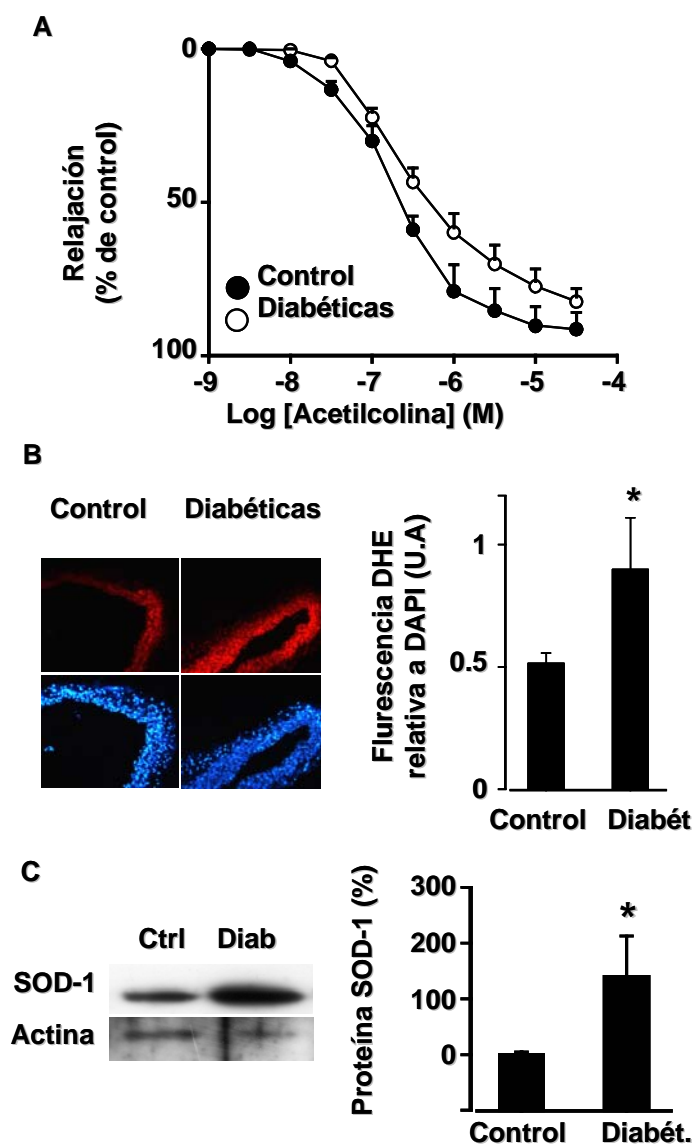


Figura R-3. Papel del superóxido. (A) Relajación a ACh tras la preincubación con SOD (100 U/mL) en AP de ratas controles y diabéticas, precontraídas con fenilefrina (10^{-7} M). (B) Imagen representativa de la producción de superóxido, proporcional a la fluorescencia de DHE (arriba) y corregida por la fluorescencia del marcador nuclear DAPI (abajo). Gráfica de barras que muestra los valores medios de la fluorescencia de DHE normalizados por DAPI. (C) Imagen representativa de la expresión de SOD en homogenizados de AP. Valores densitométricos de

la expresión de SOD normalizados por los de α -actina y expresados como porcentaje de la expresión del grupo control. Los resultados están expresados como las medias \pm e.e.m. ($n=5$ controles y $n=7$ diabéticas en A, y $n=6$ controles y $n=5$ diabéticas en C y D). * $P<0.05$ respecto a los anillos de AP controles.

1.2.4 Papel de la enzima NADPH oxidasa.

Para estudiar el posible papel que desempeña la NADPH oxidasa, se incubaron las AP en presencia de su inhibidor apocinina (3×10^{-4} M) y se estudiaron los efectos sobre la relajación a ACh (diabéticas 660 ± 135 % vs controles 100 ± 28 %, $p \leq 0,01$, figura R-4A). De forma similar a lo descrito en el apartado anterior con SOD, la inhibición de la NADPH dio

lugar a un aumento de la relajación inducida por ACh. De hecho, en presencia de apocinina no hubo diferencias significativas entre las respuestas máximas, de los grupos control y diabético (E_{\max} $94 \pm 4\%$ y $108 \pm 2\%$ respectivamente). La determinación de la expresión proteica de AP reveló que la subunidad reguladora $p47^{\text{phox}}$, estaba aumentada en las muestras diabéticas respecto a las controles (figura R-4B). El análisis de los experimentos de inmunohistoquímica realizados con anticuerpos dirigidos contra $p47^{\text{phox}}$, permitieron determinar que el aumento de dicha subunidad en los cortes de AP de diabéticas se produjo principalmente en la capa media y adventicia (figura R-4C).

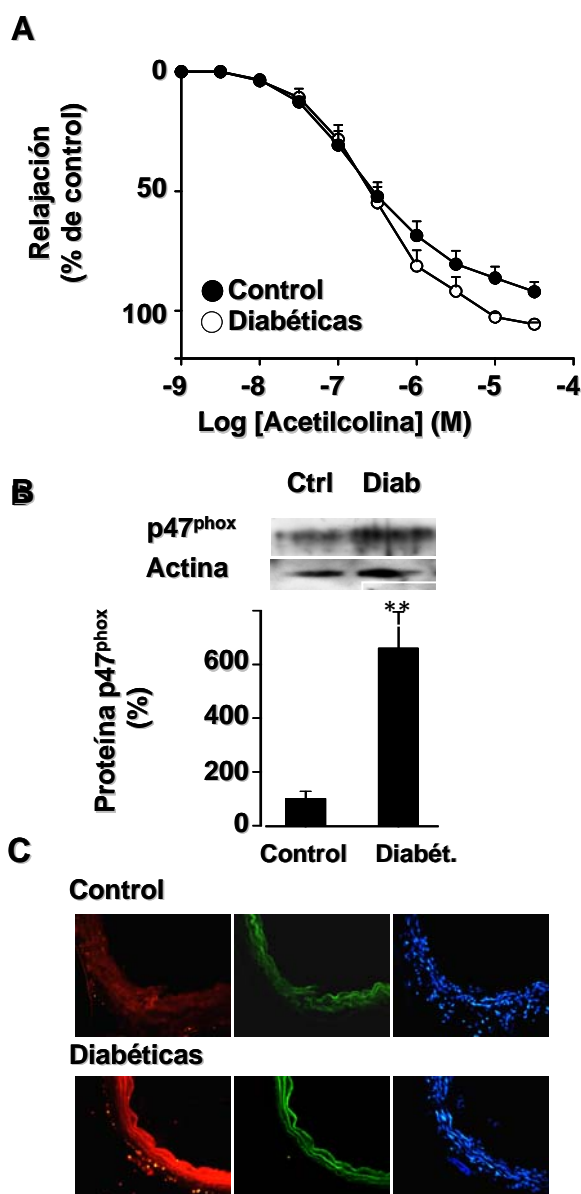


Figura R-4. Papel de la NADPH oxidasa. Efectos de la preincubación con apocinina ($300 \mu\text{M}$) sobre la relajación a ACh en AP de ratas diabéticas y controles contraídas con fenilefrina (10^{-7} M). (B) Imagen representativa de la expresión de $p47^{\text{phox}}$ en homogenizados de AP. Valores α -actina y expresados como porcentaje de la expresión del grupo control. (C) Inmunohistoquímica que muestra la localización de $p47^{\text{phox}}$ (rojo), la autofluorescencia de la elastina (verde) y de los núcleos (azul). Imágenes ($\times 400$) representativas de 10-12 cortes de 4 AP diferentes. Los resultados están expresados como la media \pm e.e.m. ($n=5-6$). ** $P < 0.01$ comparado con controles.

1.3. ESTUDIO DE MARCADORES DE HIPERTENSIÓN PULMONAR EN EL MODELO DE DIABETES TIPO 1.

En una segunda batería de experimentos se analizaron aquellos marcadores característicos de la HP descritos en la introducción. Se inyectó con estreptozotocina a ratas que fueron seguidas durante seis semanas y 4 meses. Entre los parámetros analizados se encuentran la presión arterial, la presión del ventrículo derecho, remodelado de la vasculatura pulmonar, los patrones de expresión de proteínas clave como los canales $K_v1.5$ y el receptor BMPR2, las corrientes de potasio en células aisladas y la respuesta de las AP a 5-HT.

1.3.1 Efectos de la diabetes en la presión arterial sistémica (PAS), presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) e índice de Fúlton.

La PAS sistólica y diastólica (figura R-5A), y la PSVD (figura R-5B) fueron semejantes entre ambos grupos control y diabético. Tras seis semanas de la inyección de la toxina ninguno de los parámetros indicadores de hipertrofia cardíaca fueron diferentes con respecto a las ratas controles. De este modo, los cocientes del ventrículo derecho libre de septo (VD) con la masa corporal (MC), del ventrículo izquierdo con el septo (VI+S) con la MC, así como el índice de Fulton $[VD / (VI+S)]$, no se vieron modificados por la diabetes (figura R-5C).

Sin embargo, en el grupo de diabéticas seguido durante 4 meses se encontró un aumento significativo de la PSVD (diabéticas $22,4 \pm 1,9$ mmHg vs controles $16,7 \pm 0,7$ mm Hg, $p \leq 0.05$, $n=6$ y 4 , respectivamente).

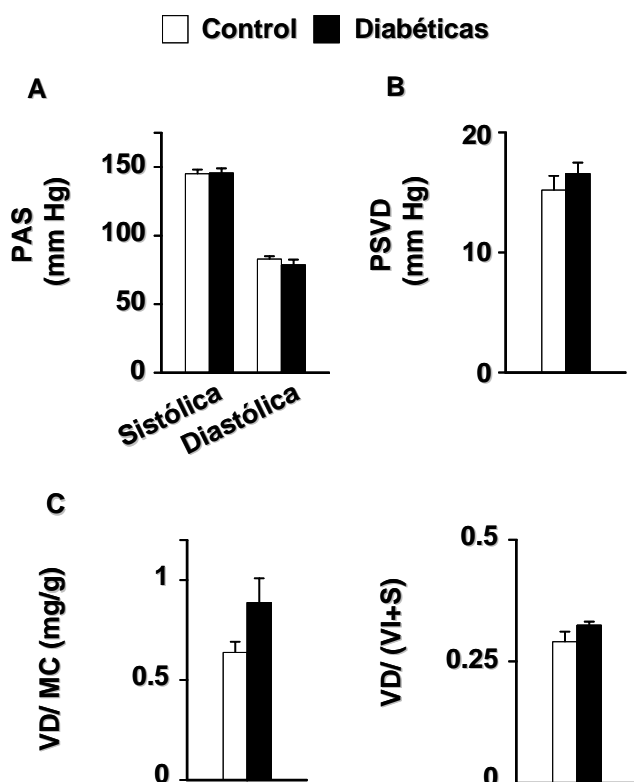


Figura R-5. (A) Efectos de la diabetes sobre la presión arterial sistémica (PAS) sistólica y diastólica (B) y la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD). (C) Relaciones del peso del ventrículo derecho con la masa corporal (VD/MC) y el índice de Fulton [VD/(VI+S)] de los grupos control (blanco, $n=5$) y diabético (negro, $n=8$). Cada barra representa la media \pm e.e.m..

1.3.2 Remodelado vascular del pulmón.

Las arterias pulmonares analizadas en tinciones de cortes de pulmón, fueron clasificadas en musculares, parcialmente musculares y no musculares según su lámina media. La distribución porcentual de los tres tipos de arterias no fue estadísticamente significativa entre controles y diabéticas (figura R-6).

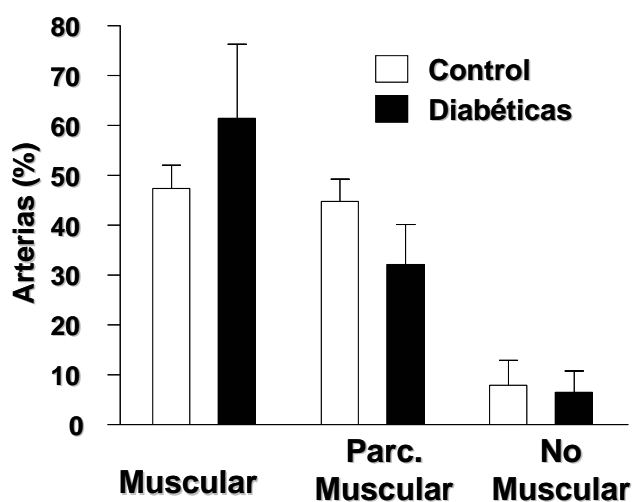


Figura R-6. Distribución de del porcentaje de arterias musculares, parcialmente musculares y no musculares entre los grupos control (blanco) y diabético (negro) ($n=4$). Cada barra representa los valores de la media \pm e.e.m..

1.3.3 Expresión pulmonar de BMPR2.

Otra proteína directamente implicada en la HP es el receptor tipo 2 de proteínas morfogenéticas ósea (BMPR2). Empleando un anticuerpo específico contra BMPR2 se detectaron varias bandas de las que se identificaron una a 115 kDa como el precursor del receptor (pro-BMPR2), y otra a 75 kDa identificada como la forma del receptor maduro. Los cambios en la expresión de pro-BMPR2 producidos por la diabetes no fueron significativos (diabéticas 78 ± 16 % vs controles 100 ± 20 %). Sin embargo la expresión de la forma madura de BMPR2 (figura R-7) se vio disminuida en las muestras de ratas diabéticas en comparación con las controles (54 ± 15 % vs 100 ± 15 % respectivamente, $p \leq 0,05$).

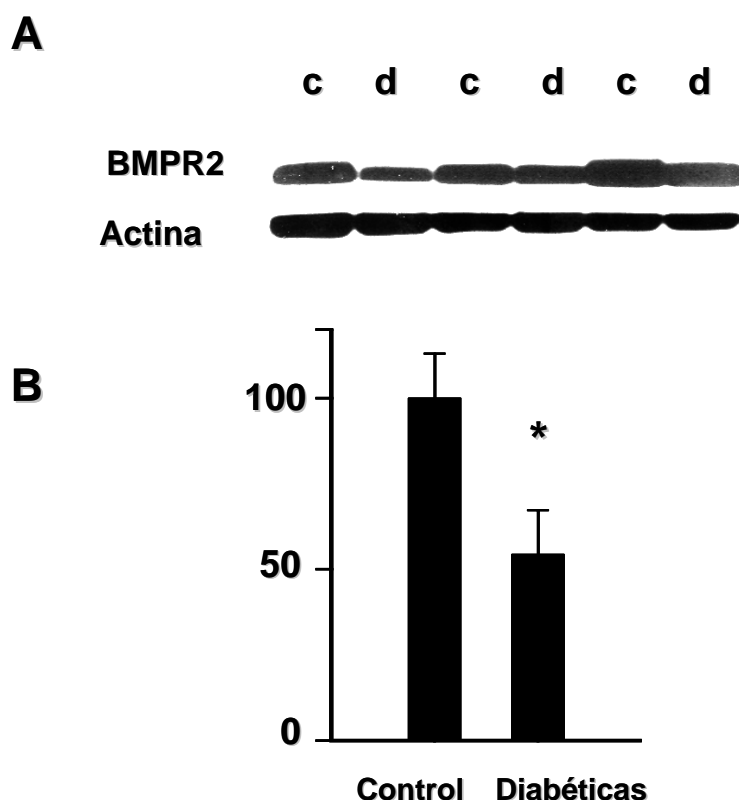


Figura R-7. (A) Imagen de western blot representativa de la expresión del receptor BMPR2 en homogenizados de pulmón control (c) y diabético (d). (B) Representación de la expresión de BMPR2 normalizados por la expresión de actina. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m.. ($n=8$). * $P<0,05$ respecto a la expresión en controles.

1.3.4 Análisis electrofisiológico y expresión de Kv1.5.

Se aislaron CMLAP mediante un tratamiento enzimático con papaína y se registraron las corrientes Kv en rangos de potenciales que fueron desde -60 mV hasta +60 mV.

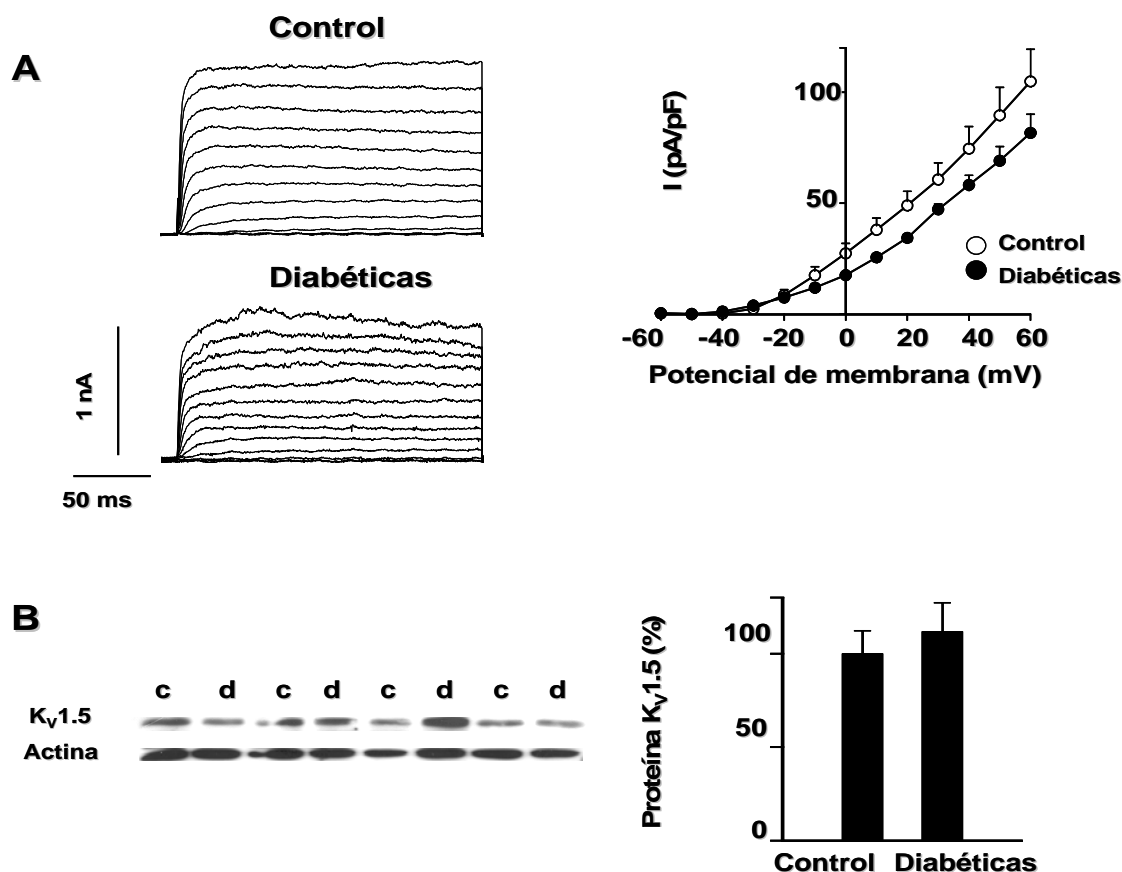


Figura R-8. (A) Trazos representativos de las corrientes evocadas por pulsos a potenciales desde -60 mV hasta +60 mV partiendo de un potencial de -60 mV (izquierda) y representación de la curva corriente-voltaje medida al final del pulso (derecha) ($n=3-4$). (B) Imagen representativa y media de los valores de la expresión proteica de Kv1.5 en homogenizados de pulmón ($n=4$). Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

No se encontraron diferencias significativas en las relaciones corriente-voltaje (figura R-8A), ni en la superficie celular estimada a través de los valores de capacitancia entre las CMLAP controles y diabéticas ($16,3 \pm 1,3$ pF vs $14,3 \pm 1,1$ pF, respectivamente). A continuación, realizamos el

estudio de la expresión proteica de una de las subunidades α de canales de potasio relacionados con la HP, $K_v1.5$. Se usó un extracto de homogenizado de pulmón, y mediante la técnica de *western blot* empleando un anticuerpo específico de $K_v1.5$, se detectó una banda en torno a 70 kDa. Los valores medios de expresión no fueron diferentes entre controles y diabéticas (figura R-8B).

1.3.5. Caracterización de la respuesta a 5-HT.

1.3.5.1 Contracción de las AP a 5-HT. Sabiendo que la 5-HT y sus receptores contribuyen a la patogénesis de la HP, se realizaron curvas concentración-respuesta a 5-HT (de 10^{-8} a 10^{-4} M) en AP de ratas controles y diabéticas (figura R-9A). Se llevó a cabo en anillos con endotelio, sin endotelio y con endotelio en presencia de L-NAME (10^{-4} M) (figura R-9B). La eliminación mecánica o farmacológica del endotelio se comprobó mediante la incapacidad de una concentración de 10^{-6} M de ACh de producir relajación de un anillo contraído con fenilefrina. La respuesta máxima a 5-HT en las AP de ratas diabéticas estaba aumentada con respecto a las controles en anillos con endotelio (E_{max} diabéticas $103 \pm 4\%$ vs controles $57 \pm 3\%$, $P < 0.01$), en los anillos tratados con L-NAME (E_{max} diabéticas $122 \pm 6\%$ vs controles $73 \pm 10\%$, $P < 0.05$) y en anillos sin endotelio (E_{max} diabéticas $130 \pm 8\%$ vs controles $88 \pm 4\%$, $P < 0.01$). En aquellos experimentos en los que se empleó L-NAME o se eliminó el endotelio, la serotonina produjo una mayor contracción comparada con la que producía en arterias con endotelio, tanto en las ratas diabéticas como en las controles. A pesar de este aumento de la respuesta a 5-HT, las diferencias de contracción entre el grupo control y diabético se mantuvieron significativas. La concentración necesaria para alcanzar el 50% del efecto máximo no se vio afectada en ninguno de los casos. Por tanto la diabetes produjo un aumento de la eficacia de contracción de la 5-HT sin afectar a la potencia y este efecto fue independiente de endotelio (figura R-9C).

En experimentos adicionales se llevó a cabo en paralelo un tratamiento con insulina. La contracción máxima a 5-HT en las AP de ratas tratadas con insulina estaba reducida respecto a la observada en las diabéticas sin tratar (E_{max} $115 \pm 17\%$ vs $201 \pm 17\%$ respectivamente).

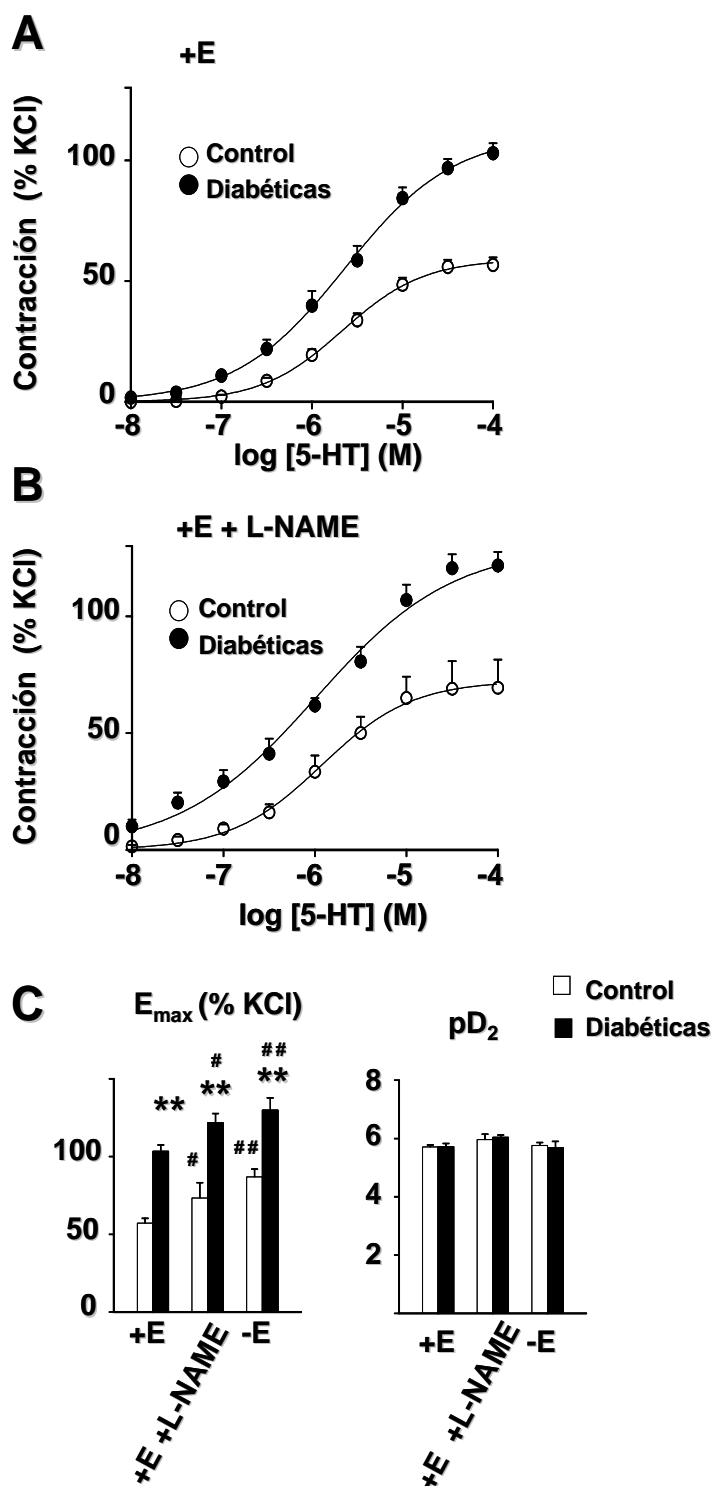


Figura R-9. Curvas concentración respuesta a 5-HT en AP con endotelio (+E) de ratas controles o diabéticas en (A) ausencia ($n=13-17$) o (B) presencia ($n=5$ y 7) de L-NAME 10^{-4} M. (C) Valores de E_{max} y pD_2 calculados en los grupos control y diabético, con endotelio, en presencia de L-NAME y sin endotelio. ** $P<0,01$ comparado con control. # y ## $P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente, comparado con los experimentos con endotelio intacto. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

1.3.5.2. Estudio del papel de los receptores 5-HT_{2A} en la contracción a 5-HT. Conociendo la relevancia del papel de los receptores 5-HT_{2A} en los efectos de 5-HT sobre las AP (Cogolludo *et al.*, 2006a, MacLean *et al.*, 1996a) se analizaron las curvas concentración respuesta de 5-HT en AP con endotelio y sin endotelio, en presencia del antagonista selectivo de 5-HT_{2A} ketanserina, así como la expresión proteica de dichos receptores. La ketanserina produjo un desplazamiento de la curva de 5-HT a la derecha, y por tanto la disminución de los valores de pD₂, que fue similar en controles y diabéticas, independientemente de la presencia o ausencia de endotelio (figura R-10A). La potencia antagonista (pK_B) de ketanserina fue similar para los experimentos realizados con endotelio y sin endotelio, en controles y en diabéticas (figura R-10B). Los valores similares de la potencia antagonista de ketanserina en todas las condiciones estudiadas, indican una contribución similar de los receptores 5-HT_{2A} en la contracción de 5-HT en los distintos grupos experimentales.

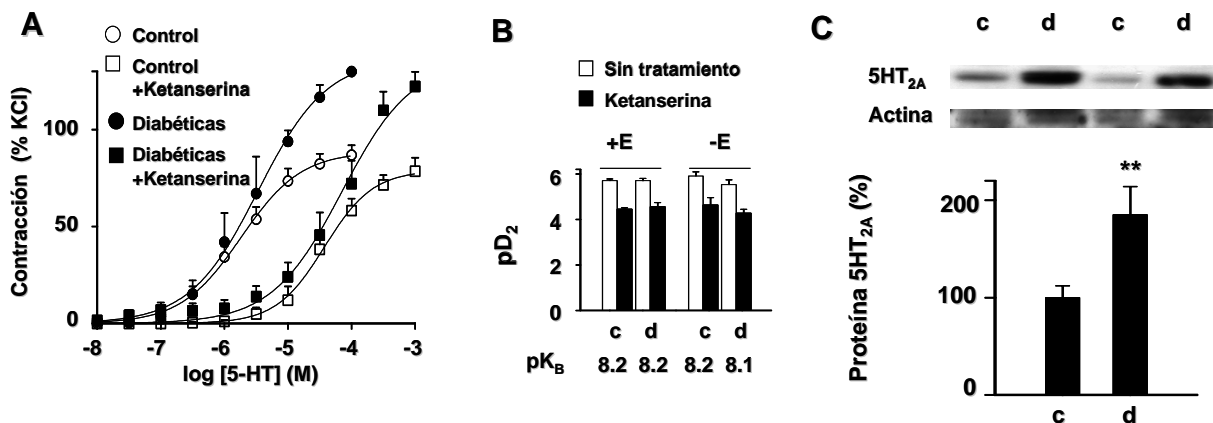


Figura R-10. (A) Efectos de la ketanserina, antagonista de los receptores 5-HT_{2A} (10⁻⁷M) sobre la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en AP sin endotelio (n=5-7). (B) Valores de pD₂ y pK_B en AP con endotelio (+E) y sin endotelio (-E) (C) Imagen representativa y valores medios de la expresión de los receptores 5-HT_{2A} en pulmón de ratas diabéticas corregido por los valores de expresión de β-actina (d, n=8) y ratas controles (c, n=8). ** P<0.01 respecto a control. Los resultados están expresados como los valores medios ± e.e.m..

El análisis de la expresión proteica de 5-HT_{2A} en homogenizados de pulmón (figura R-10C) mostró un aumento de la estos receptores en las muestras de las ratas diabéticas (controles 100 ± 12 % vs diabéticas 186 ± 29 %, $p < 0.01$)

1.3.5.3. Papel de la ciclooxygenasa y del anión superóxido en la respuesta a 5-HT en diabetes. Conociendo la importancia de COX en la respuesta contráctil en AP de modelos animales de HP por hipoxia intermitente (Thomas y Wanstall, 2003), así como en la diabetes a nivel sistémico (Shi y Vanhoutte, 2008), decidimos estudiar los efectos del inhibidor no selectivo de COX indometacina, sobre la curva de 5-HT en AP con endotelio. El hecho de que la indometacina redujera la respuesta máxima a 5-HT en las ratas diabéticas (figura R-11A), indica la relevancia de esta enzima en el fenómeno observado. Por otro lado, la indometacina potenció la contracción a 5-HT en ambos grupos (figura R-11C). En presencia del inhibidor selectivo para COX-2 NS398, la respuesta a 5-HT en AP de controles no se vio modificada. Sin embargo, en las ratas diabéticas este fármaco previno el aumento de respuesta a 5-HT y produjo un desplazamiento de la curva hacia la derecha (figura R-11B), disminuyendo el valor de pD₂ (figura R-11C). Tras estudiar la expresión de COX-2 en homogenizados de AP se comprobó que, apoyando el papel de COX-2 en las respuestas vasculares, la cantidad de ésta enzima estaba marcadamente aumentada en AP de ratas diabéticas (figura R-11D).

Como se describe en la primera sección de los resultados, existe un aumento de la producción de O₂⁻ procedente de la NADPH oxidasa en AP de ratas diabéticas que produce disfunción endotelial. Para estudiar la implicación de O₂⁻ en la respuesta a 5-HT, se comprobó la respuesta a 5-HT en AP con endotelio tratadas con SOD o con el inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina. La contracción inducida por 5-HT en las

ratas controles fue similar en presencia y en ausencia de estos fármacos. Sin embargo, el tratamiento con SOD (figura R-12A) o con apocinina (figura R-12B), previno el aumento de la respuesta contráctil a 5-HT observado en las ratas diabéticas (E_{\max} con SOD, diabéticas $66 \pm 3\%$ vs controles $61 \pm 1\%$ y E_{\max} con apocinina, diabéticas $68 \pm 1\%$ vs controles $62 \pm 2\%$).

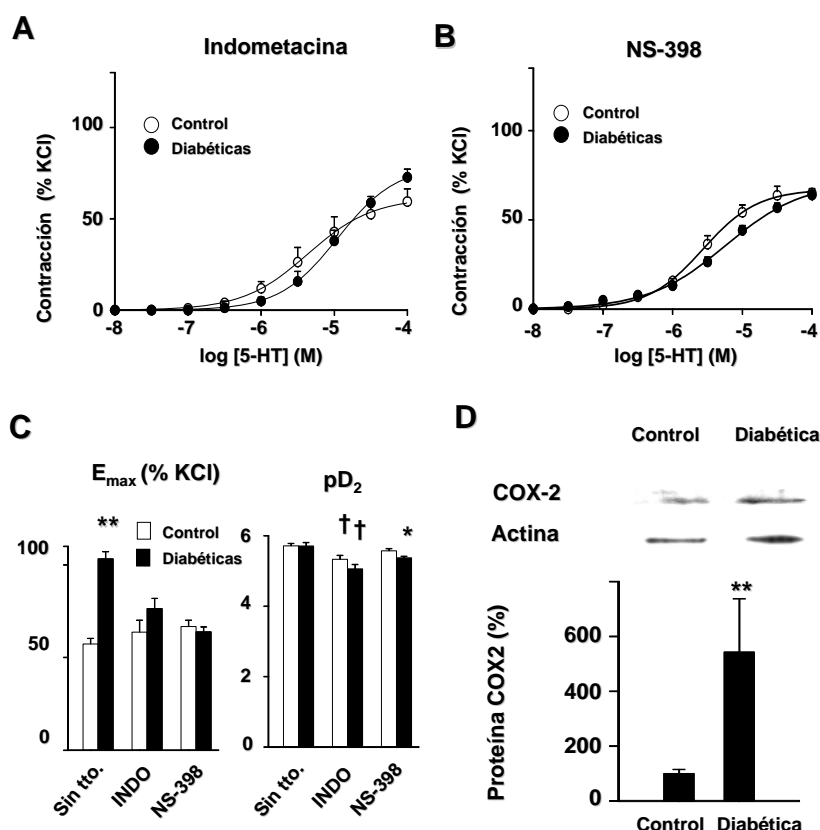


Figura R-11. (A) Efectos del inhibidor no selectivo de COX indometacina (INDO, $10^{-5}M$) y (B) y de NS-398, inhibidor selectivo para COX2 ($10^{-5}M$) en la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en AP con endotelio ($n=6$). (C) Valores de E_{\max} y pD_2 de 5-HT en ausencia (sin tto.) o en presencia de los fármacos indometacina y NS-398, calculados a partir de las curvas de la figura R-9 y de los paneles A y B, respectivamente. (D) Expresión de COX2 en AP de ratas controles y diabéticas normalizados por los valores de expresión de la α -actina ($n = 5$ y 6 , respectivamente). *,** indican $P<0.05$ y $P<0.01$, respectivamente, diabéticas respecto a controles; † indica $P<0.05$ indometacina vs sin fármaco. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

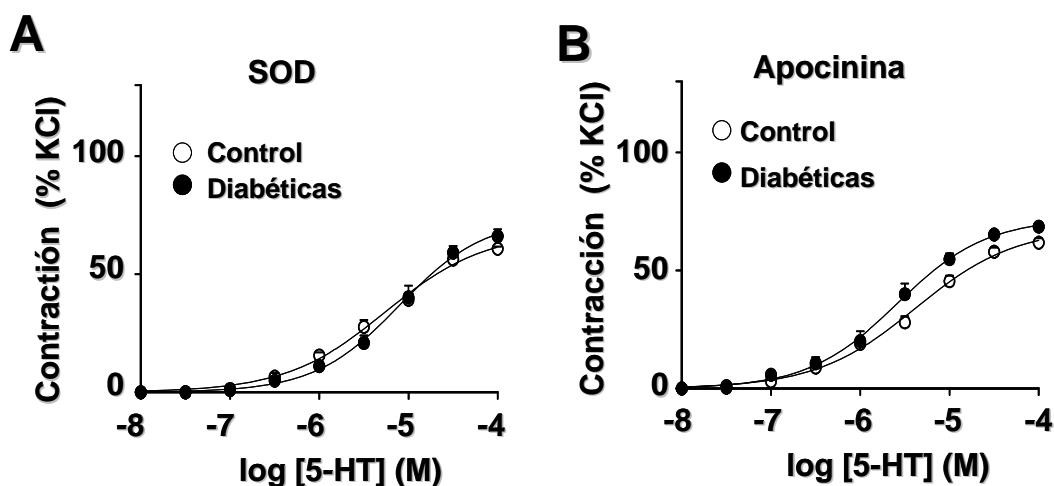


Figura R-12. Efectos de (A) superóxido dismutasa (SOD, 100 U/ml) y (B) apocinina, inhibidor de la NADPH oxidasa ($3 \times 10^{-4} M$), sobre la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en AP con endotelio ($n=6$) de ratas control y diabéticas. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

1.3.5.4. Efectos sobre la contracción a 5-HT del tromboxano A_2 (TXA_2) y superóxido en condiciones control. Complementariamente a los resultados expuestos en el apartado anterior, se crearon unas condiciones con la intención de mimetizar las condiciones diabéticas *in vitro*. Para ello se empleó un donador no enzimático de O_2^- (pirogalol), y un análogo del TXA_2 (U46619), uno de los principales metabolitos de la COX-2 con actividad vasoconstrictora cuyos niveles están aumentados en diversas formas de HP (Christman *et al.*, 1992). Se emplearon concentraciones de estos fármacos que produjeran 5-15% de la respuesta inducida por KCl ($3 \times 10^{-6} M$ y $10^{-8} M$ respectivamente). El pirogalol aumentó la respuesta máxima de 5-HT (figura R-13A) sin modificar el valor de pD_2 y este efecto se previno en presencia de indometacina, mimetizando el efecto observado en las ratas diabéticas. Por otro lado, el U46619 potenció la respuesta a 5-HT disminuyendo los valores de pD_2 y este efecto no se previno con apocinina. Sin embargo, no afectó al efecto máximo inducido por 5-HT (Figura R-13B).

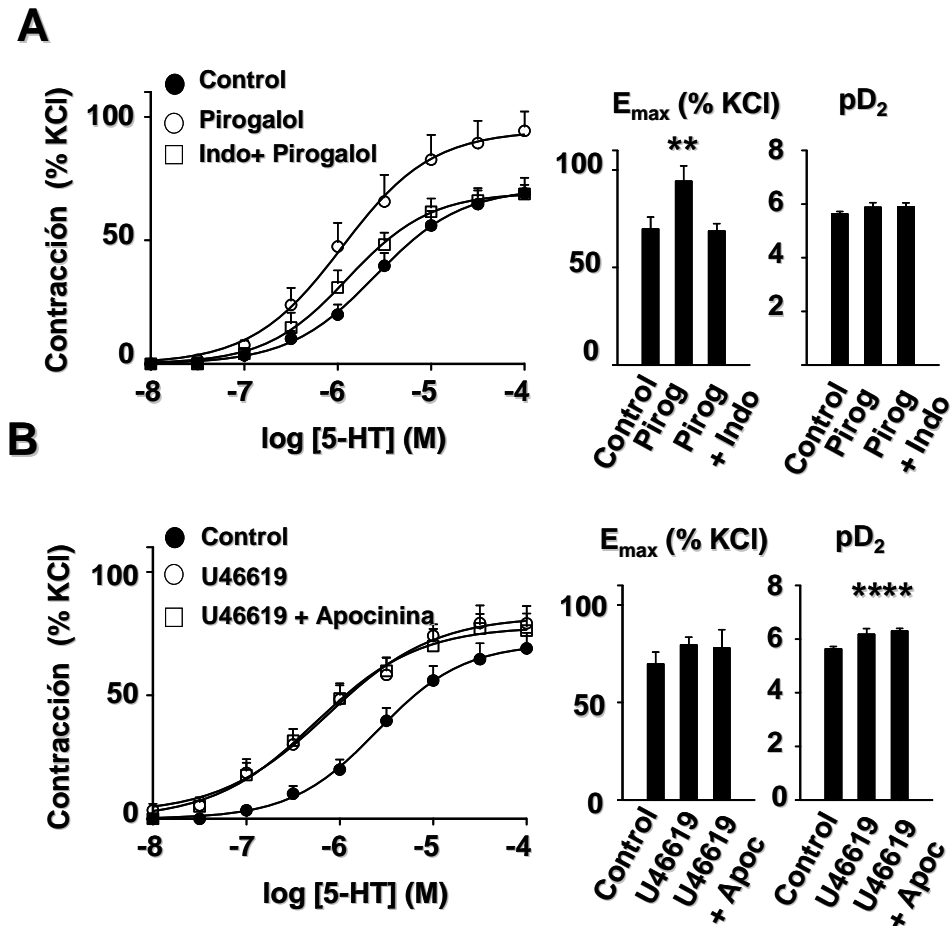


Figura R-13. La adición exógena de superóxido y del análogo de TXA₂, U46619, aumentan la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en AP de ratas control. Efectos de (A) pirogalol, productor no enzimático de superóxido (pirog, $3 \times 10^{-6} M$) en ausencia o presencia de indometacina (indo, $10^{-5} M$) y (B) U46619, análogo de TXA₂ ($10^{-8} M$) en presencia o ausencia de apocinina (apoc, $3 \times 10^{-4} M$) sobre la respuesta vasoconstrictora a 5-HT ($n=4-8$). ** indica $P < 0.01$ control vs fármaco. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

**2. ESTUDIO DE LA CONTRACTILIDAD DE AP, FUNCIÓN
ENDOTELIAL Y MARCADORES DE HP EN EL MODELO DE
RESISTENCIA A LA INSULINA.**

Se emplearon ratas Zucker delgadas y obesas, de 17-18 semanas de edad como modelo de resistencia a la insulina. Las ratas obesas presentaron una mayor masa corporal comparadas con las ratas controles delgadas. Igualmente los niveles de insulina plasmática estaban aumentados en el grupo de las ratas obesas. Sin embargo, los niveles de glucemia no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos (Tabla R-1)

Tabla R-1. Valores de masa, insulinemia y glucemia en ratas Zucker delgadas y obesas. Los valores de *n* se indican entre paréntesis. ** indica $p \leq 0,01$ respecto al grupo delgado.

	Masa (g)	Insulinemia (ng/mL)	Glucemia (mg/dL)
Zucker delgadas	364 ± 22 (20)	1,4 ± 0,2 (7)	106 ± 20 (13)
Zucker obesas	476 ± 29** (20)	3,5 ± 0.2 ** (7)	128 ± 47 (12)

2.1. ESTUDIO DE LA CONTRACTILIDAD DE AP EN EL MODELO DE RESISTENCIA A LA INSULINA.

2.1.1. Contractilidad de las AP de conductancia.

Se analizaron las respuestas a KCl, fenilefrina, 5-HT y al agonista selectivo de 5-HT₂ 5- α -metil-5-HT, en anillos de AP de conductancia procedentes de ratas Zucker obesas comparadas con sus controles delgados. Las respuestas a KCl (80 mM) y a fenilefrina (10⁻⁴M) fueron similares entre los grupos obeso y delgado (figura R-14A). Las curvas

concentración respuesta a fenilefrina, 5-HT (figura R-14B) y α -metil-5-HT, determinaron que no había diferencias en la potencia ni en la eficacia entre ambos grupos para ninguno de los vasoconstrictores mencionados (tabla R-2).

Tabla R-2. Valores de E_{max} y pD_2 de los vasoconstrictores indicados en arterias pulmonares de conductancia. Los valores de n se indican entre paréntesis.

	AP conductancia			
	E_{max} (% de KCl)		pD_2	
	Lean	Obesa	Lean	Obesa
Fenilefrina	82,6 \pm 3,2 (5)	83,7 \pm 4,1 (5)	8,20 \pm 0,03	8,1 \pm 0,09
5-HT	64,3 \pm 6,5 (5)	64,4 \pm 7,2 (5)	5,28 \pm 0,13	5,02 \pm 0,11
α-metil-5-HT	41,0 \pm 9,5 (6)	30,8 \pm 6,8 (6)	5,32 \pm 0,13	5,46 \pm 0,12

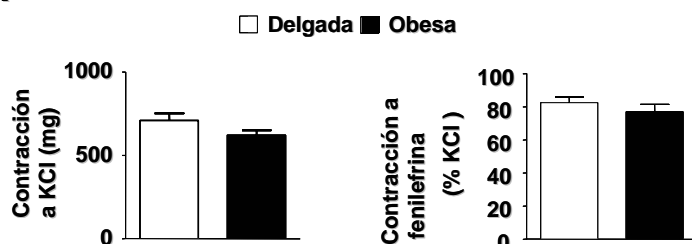
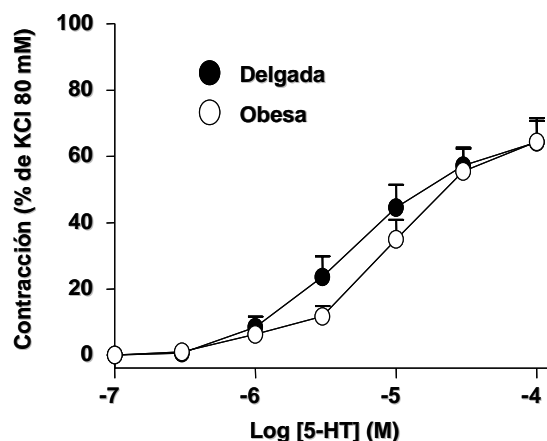
A

Figura R-14. (A) Respuesta contráctil de AP de conductancia de ratas obesas y delgadas a KCl (80 mM, n=5) y fenilefrina (10⁻⁷ M, n=5). (B) Curva concentración respuesta a 5-HT en AP de conductancia de Zucker obesas y controles (n=6). Los resultados están expresados como los valores medios \pm error estándar medio.

B

2.1.2. Contractilidad de las AP de resistencia.

Se montaron AP de resistencia en miógrafo para analizar la contractilidad a diferentes agentes vasoconstrictores. Sorprendentemente la contracción inducida por 80 mM de KCl en la AP de resistencia de ratas obesas fue ~20 % menor que la respuesta registrada en las delgadas (delgadas 3 ± 0.25 mN vs obesas 2.5 ± 0.2 mN, $P < 0.05$). Igualmente las respuestas a hipoxia (delgadas 5.5 ± 0.4 % vs obesas 2.5 ± 0.8 %, $P < 0.05$), fenilefrina (delgadas 58 ± 4 % vs obesas 31 ± 4 %, $P < 0.05$), y a 5-HT (tabla R-3), expresadas como porcentaje de la contracción a KCl, estaban disminuidas en las ratas obesas comparadas con las delgadas (figura R-15A). Las curvas concentración respuesta a 5-HT (figura R-15B) y a α -metil-5-HT mostraron que ambos agentes alcanzaron una menor eficacia de contracción, indicado por unos valores de E_{\max} menores respecto a las respuestas en las ratas delgadas (tabla R-3). Igualmente la potencia, indicada por los valores de pD_2 para 5-HT, estaba disminuida en las ratas obesas.

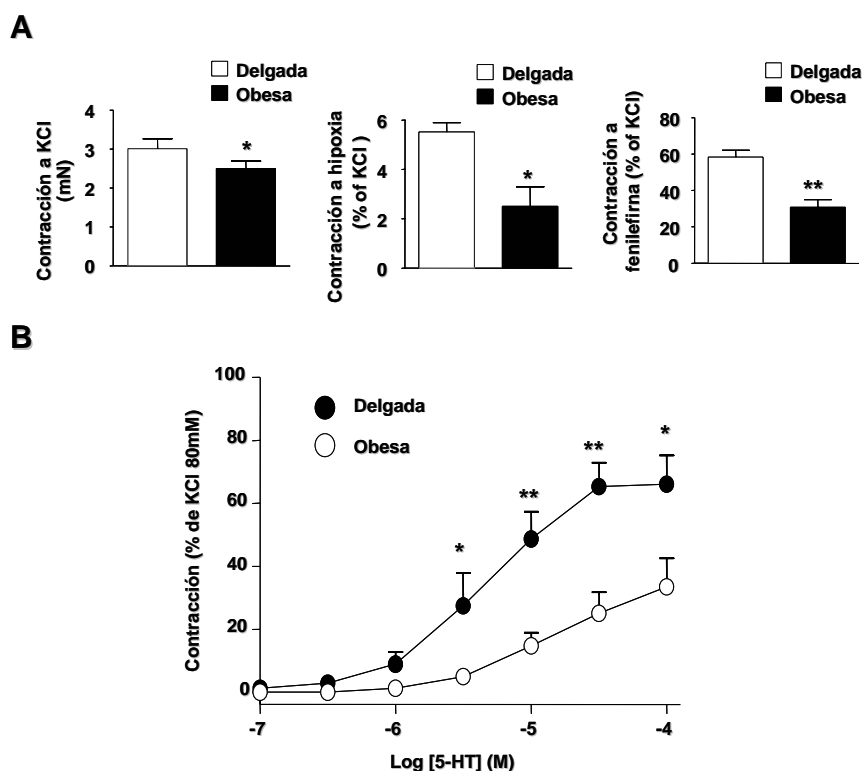


Figura R-15. (A) Respuesta contráctil de AP de resistencia de ratas obesas y delgadas a KCl (80 mM, $n=8$), hipoxia ($n=3$) y fenilefrina (10^{-7} M, $n=3-4$). (B) Curva concentración respuesta a 5-HT en AP de resistencia obesas y controles ($n=6$). Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m. * y ** significan $P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente, Zucker obesas respecto a delgadas.

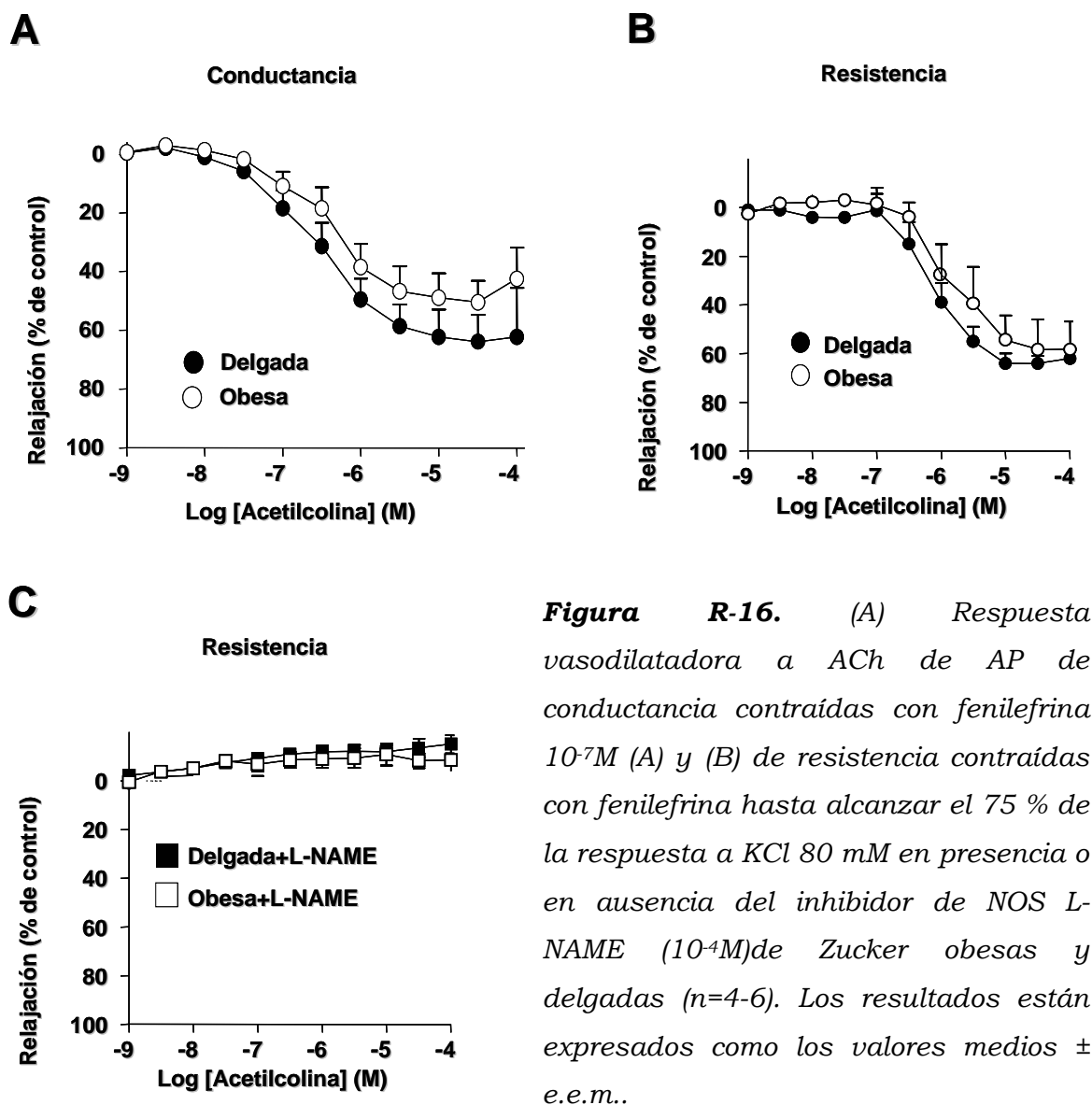
Tabla R-3. Valores de E_{max} y pD_2 de los vasoconstrictores indicados AP de resistencia. Los valores de n se indican entre paréntesis. * y ** indican $P < 0.05$ y $P<0.01$, respectivamente respecto al grupo delgado.

	AP resistencia			
	E_{max} (% de KCl)		pD_2	
	Delgada	Obesa	Delgada	Obesa
5-HT	69,2 \pm 7,8 (6)	33,5 \pm 9,1* (5)	5,28 \pm 0,10	4,86 \pm 0,06**
α-metil-5-HT	33,7 \pm 8,8 (4)	9,5 \pm 3,6* (4)	5,80 \pm 0,11	5,58 \pm 0,10

2.2. MEDIDA DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL MODELO DE RESISTENCIA A LA INSULINA.

2.2.1. Respuesta a ACh.

La función endotelial se valoró en anillos de AP de conductancia (1-1,2 mm de diámetro) y resistencia (0,5-0,8 mm de diámetro) con el endotelio intacto. Se analizó la respuesta a concentraciones crecientes de ACh en anillos de AP que fueron previamente contraídos con fenilefrina de forma que alcanzase un ~75% de la respuesta máxima a KCl. Cabe destacar que, al inicio de los experimentos, los anillos de AP de resistencia de ratas obesas necesitaron concentraciones mayores de fenilefrina para alcanzar un tono similar al de las ratas delgadas ($5 \pm 2 \times 10^{-6}$ M vs $7 \pm 2 \times 10^{-7}$ M, respectivamente). La eficacia vasodilatadora de ACh fue similar en ambos grupos, en AP de conductancia (figura R-16A, E_{\max} obesas 53 ± 7 vs control 67 ± 9 %) y en AP de resistencia (figura R-16B, E_{\max} obesas 59 ± 8 vs control 66 ± 4 %). Del mismo modo, la potencia de la ACh no fue diferente entre los grupos en AP de conductancia (pD_2 , obesas $6,4 \pm 0,1$ vs control $6,2 \pm 0,2$) ni en AP de resistencia (pD_2 , obesas $6,1 \pm 0,2$ vs control $5,8 \pm 0,2$).



2.2.2. Contribución de la vía del NO.

La inhibición inespecífica de las NO sintasas mediante L-NAME (10^{-4} M) en arterias de resistencia, redujo significativamente la concentración de fenilefrina necesaria para alcanzar el 75 % de la contracción a KCl 80 mM (obesas $3 \pm 2 \times 10^{-8}$ M vs control $2 \pm 0,6 \times 10^{-8}$ M). En presencia de L-NAME se previno completamente la relajación inducida por ACh en AP de resistencia de ambos grupos (figura R-16C).

Adicionalmente, la relajación independiente de endotelio inducida por NPS (figura R-17A) en AP de conductancia, fue completa y similar en ambos grupos. Adicionalmente, tanto la expresión de ARN mensajero de eNOS en homogenizados de AP de resistencia, como su expresión proteica en homogenizados de pulmón, fue similar en ambos grupos (figura R-17B y C).

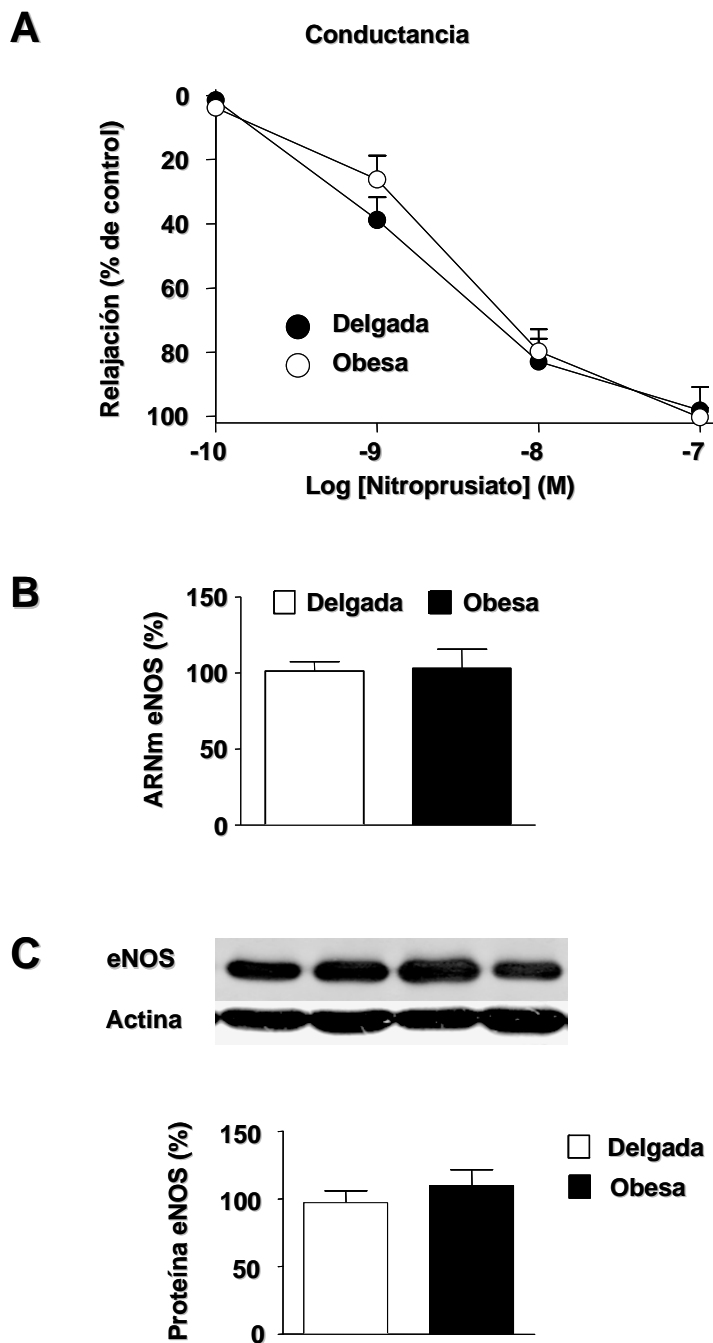


Figura R-17. (A) Curva concentración respuesta a nitroprusiato en AP de conductancia de ratas obesas y delgadas, en presencia de L-NAME ($10^{-4}M$) previa contracción con 5-HT ($10^{-4}M$) ($n=5$). (B) Niveles de expresión de ARNm ($n=5$) y (C) de proteína de eNOS ($n=5$) analizados en homogenizados de AP y pulmón respectivamente. Los resultados están expresados como las medias \pm e.e.m..

2.3. ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE HP EN EL MODELO DE RESISTENCIA A LA INSULINA.

De forma similar a lo realizado en el modelo de la diabetes tipo 1, se analizaron diversos parámetros estrechamente relacionados con la HP. Se realizaron cortes histológicos de los corazones incluidos en parafina, para la medida del grosor de las paredes como indicador de hipertrofia cardiaca. Se compararon las corrientes K_v de CMLAP de ambos grupos, y la expresión de la subunidad $K_v1.5$ mediante *western blot* y RT-PCR. De la misma forma se analizó la expresión de ARNm y proteína de BMPR2, así como se profundizó en las respuestas a 5-HT de las AP.

2.3.1. Análisis del grosor de las paredes cardiacas.

El aumento de la presión en las AP puede generar de modo compensatorio, un engrosamiento de las paredes del VD. Las medidas en cortes de los corazones de ambos grupos, reflejaron que no existían diferencias en el grosor de las paredes del VD, VI ni el septo (figura R-18).

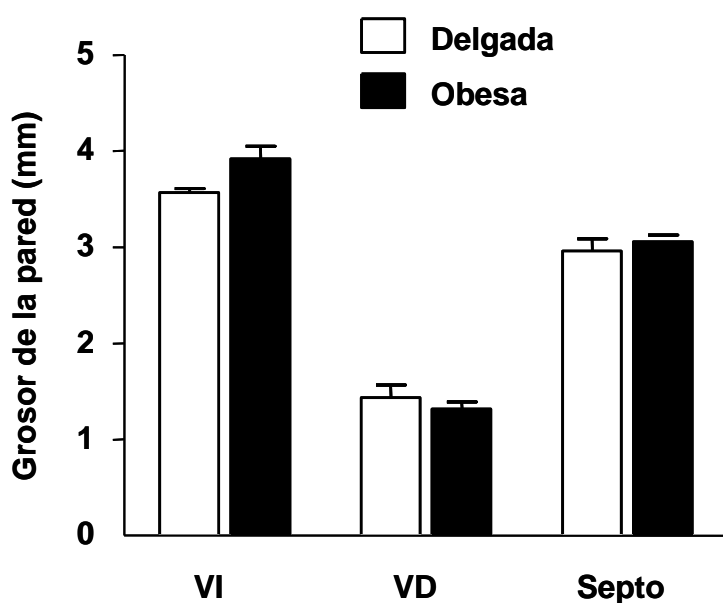


Figura R-18. Medidas del grosor de las paredes del ventrículo izquierdo (VI), ventrículo derecho (VD) y del septo (S) de los corazones de ratas Zucker obesas ($n=7$) y delgadas ($n=8$). Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

2.3.2. Expresión de BMPR2.

Los niveles de expresión de ARNm de BMPR2 en AP de resistencia, fueron similares entre los grupos de ratas obesas y delgadas (figura R-19A). Por otro lado, se cuantificó mediante *western blot* la expresión proteica de BMPR2 en homogenizados de pulmón. Se detectaron bandas a 75 y 115 kDa que se identificaron como BMPR2 y el precursor de este receptor. Se encontraron niveles de expresión similares de ambas formas del receptor BMPR2, tanto en el grupo de ratas obesas como en el grupo de las delgadas (figura R-19B).

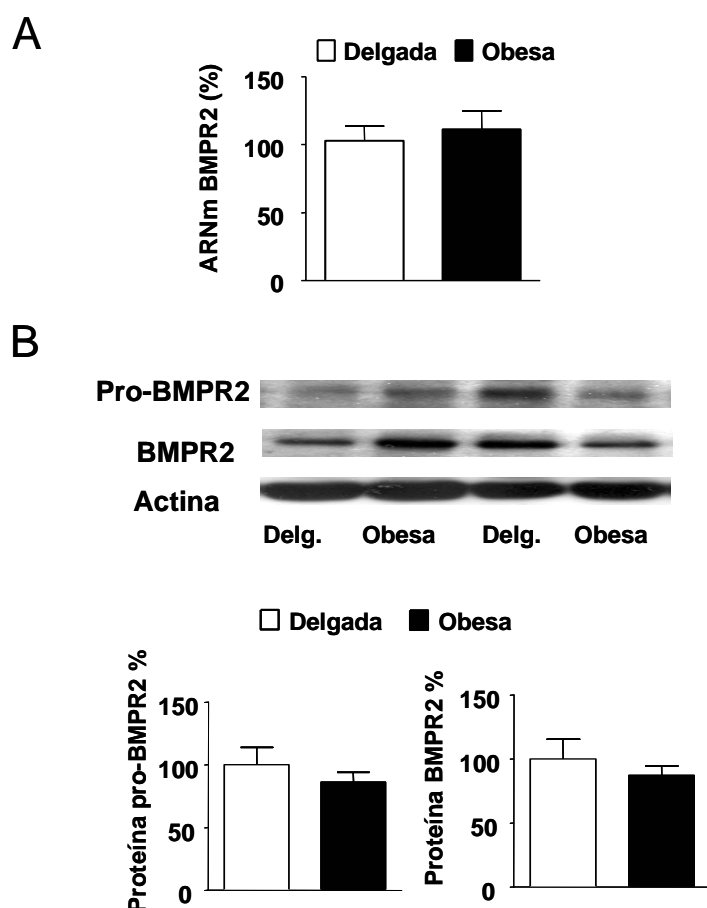


Figura R-19. (A) Expresión del ARNm de BMPR2 analizado por RT-PCR en homogenizados de AP de resistencia de ratas obesas y delgadas ($n=5$). (B) Imagen representativa y gráfica de barras mostrando los valores medios de la expresión proteica del precursor de BMPR2 (pro-BMPR2, 115 kDa) y del receptor maduro (75 kDa) en homogenizados de pulmón de Zucker obesas y delgadas ($n=8$). Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m..

2.3.3. Análisis electrofisiológico y expresión de $K_v1.5$.

No se encontraron diferencias entre los grupos Zucker obeso y delgado, en la densidad de corriente K_v de CMLAP de resistencia (figura R-20A), ni en las medidas de la capacitancia celular (obesas $17,8 \pm 1,1$ y controles $18,4 \pm 0,7$ pF).

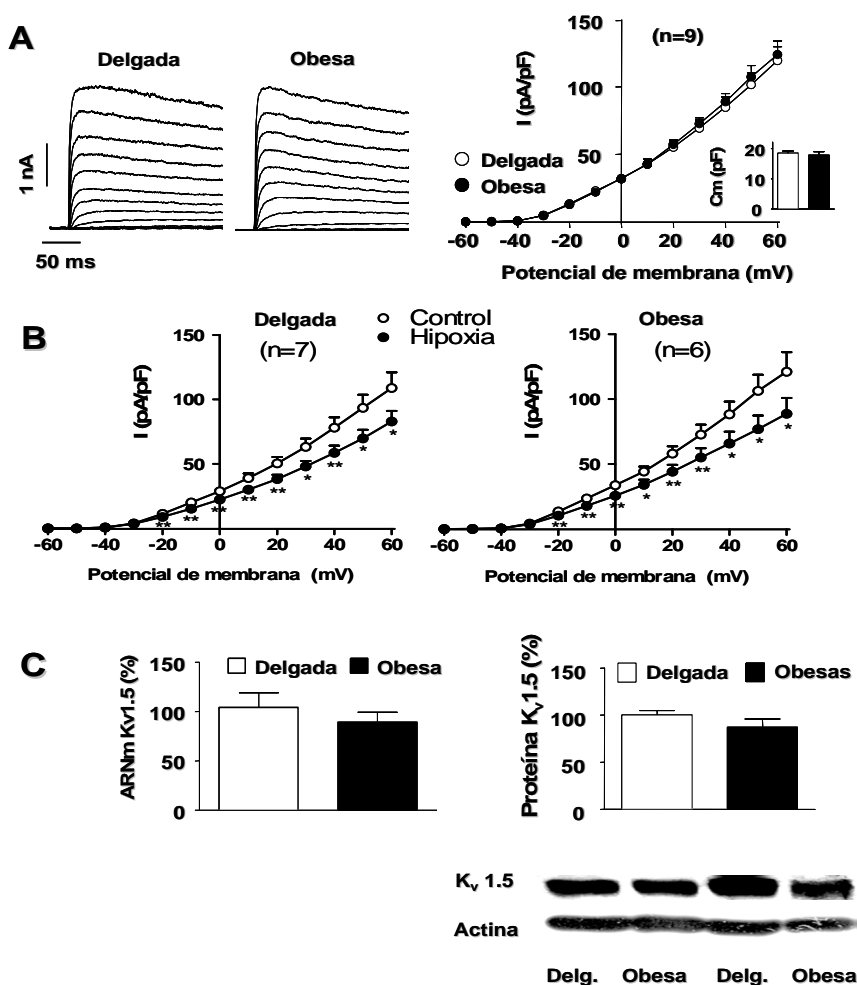


Figura R-20. (A) Trazos representativos de las corrientes obtenidas al aplicar pulsos de -60 mV hasta +60 mV, desde un potencial de partida de -60 mV en incrementos de 10 mV (izquierda). Representación corriente voltaje de los valores de corriente medida al final del pulso de 200 ms ($n=9$), y valores medios de capacitancia (C_m , derecha). (B) Relación intensidad-voltaje de efectos de la hipoxia aguda sobre las corrientes K_v de CMLAP de ratas Zucker delgadas y obesas. (C) Valores medios de ARNm de $K_v1.5$ en homogenizados de AP ($n=5$) y (D) expresión proteica de $K_v1.5$ en homogenizados de pulmón ($n=6$), normalizados por los valores de β -actina. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m.. *, ** indican $P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente.

Se compararon los efectos agudos de la hipoxia sobre las corrientes K_v de CMLAP, haciendo circular una solución externa previamente burbujeada con N_2 . En ambos grupos la hipoxia produjo un efecto similar (figura R-20B), registrándose a +30 mV una reducción de las corrientes K_v de un $24 \pm 5 \%$ en las obesas y de un $23 \pm 3 \%$ en las delgadas. Adicionalmente y apoyando los datos electrofisiológicos, la expresión de ARNm y de proteína de $K_v1.5$ fue similar en ambos grupos (figuras R-20C).

2.3.4. Estudio de la respuesta de las AP a 5-HT.

Los resultados descritos hasta este momento, determinan que las ratas Zucker obesas tienen una menor respuesta a agentes vasoconstrictores en las AP de resistencia, pero no las de conductancia (figuras R-14 y R-15). Como se menciona en la introducción, existen numerosas publicaciones en las que se describe que las respuestas contráctiles a en AP están aumentadas en diferentes modelos de HP (Le Cras et al., 2000, Keegan et al., 2001, Rodat et al., 2007). Sin embargo en el modelo de Zucker obesa hemos encontrado el efecto contrario. Con la intención de conocer la fuente de esa menor respuesta contráctil se realizó un estudio detallado de la respuesta a 5-HT.

2.3.4.1. Estudio del papel de los receptores 5-HT_{2A} en la contracción a 5-HT. Los niveles de expresión del receptor 5-HT_{2A} de homogenizados de pulmón fueron similares entre ambos grupos (figura R-21), lo que permitió descartar la disminución de la expresión de dichos receptores en las AP de ratas obesas como origen de la menor respuesta contráctil a 5-HT.

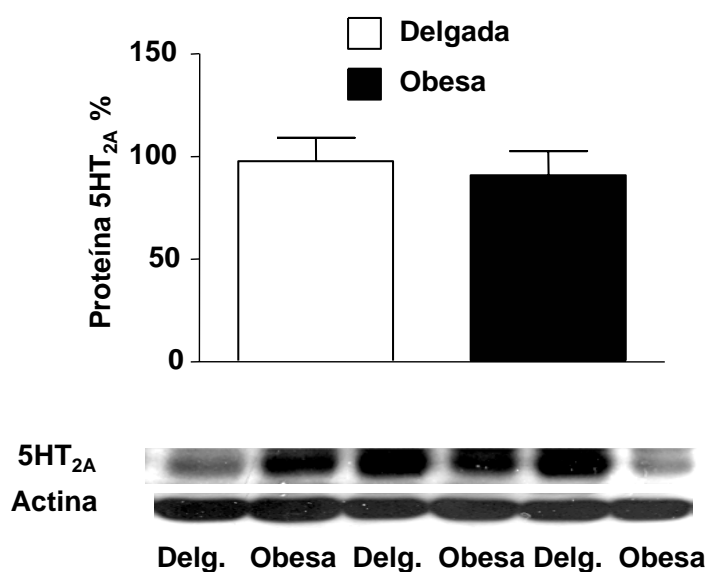


Figura R-21. Imagen representativa y valores medios de la expresión proteica de receptor 5-HT_{2A} de homogenizados de pulmón de ratas Zucker obesas y delgadas (n=8) normalizados por los valores de β -actina.

2.3.4.2. Papel de NOS inducible. En el apartado 2.1.2 se describe como la adición de L-NAME en las AP de ratas obesas, reduce significativamente la concentración de fenilefrina necesaria para alcanzar una contracción similar a la registrada en las delgadas. Estos datos resaltaban la implicación del NO en la menor respuesta registrada en las AP de ratas obesas. Sobre la contracción generada por 10^{-4} M de 5-HT (obesas 34 ± 9 % y delgadas 66 ± 9 %), se añadió L-NAME (10^{-4} M). La adición de L-NAME produjo un efecto adicional en ambos grupos, alcanzándose valores de contracción de 72 ± 13 % en las obesas y de 85 ± 11 % en las delgadas (figura R-22A). Por lo tanto, en presencia de L-NAME desaparecía la diferencia en la contracción a 5-HT entre el grupo obeso y delgado. A continuación, se realizaron curvas a 5-HT en presencia del inhibidor selectivo de la NOS inducible 1400W (10^{-5} M). La presencia de 1400W normalizó las respuestas a 5-HT de las ratas obesas, sin afectar a las respuestas de las ratas delgadas (figura R-22B). Adicionalmente, la expresión de iNOS estaba aumentada en las AP de las ratas obesas respecto a las de las controles (figura R-22C). Estos datos indicaban un papel de la iNOS en la hiporespuesta observada en las AP de las ratas Zucker obesas.

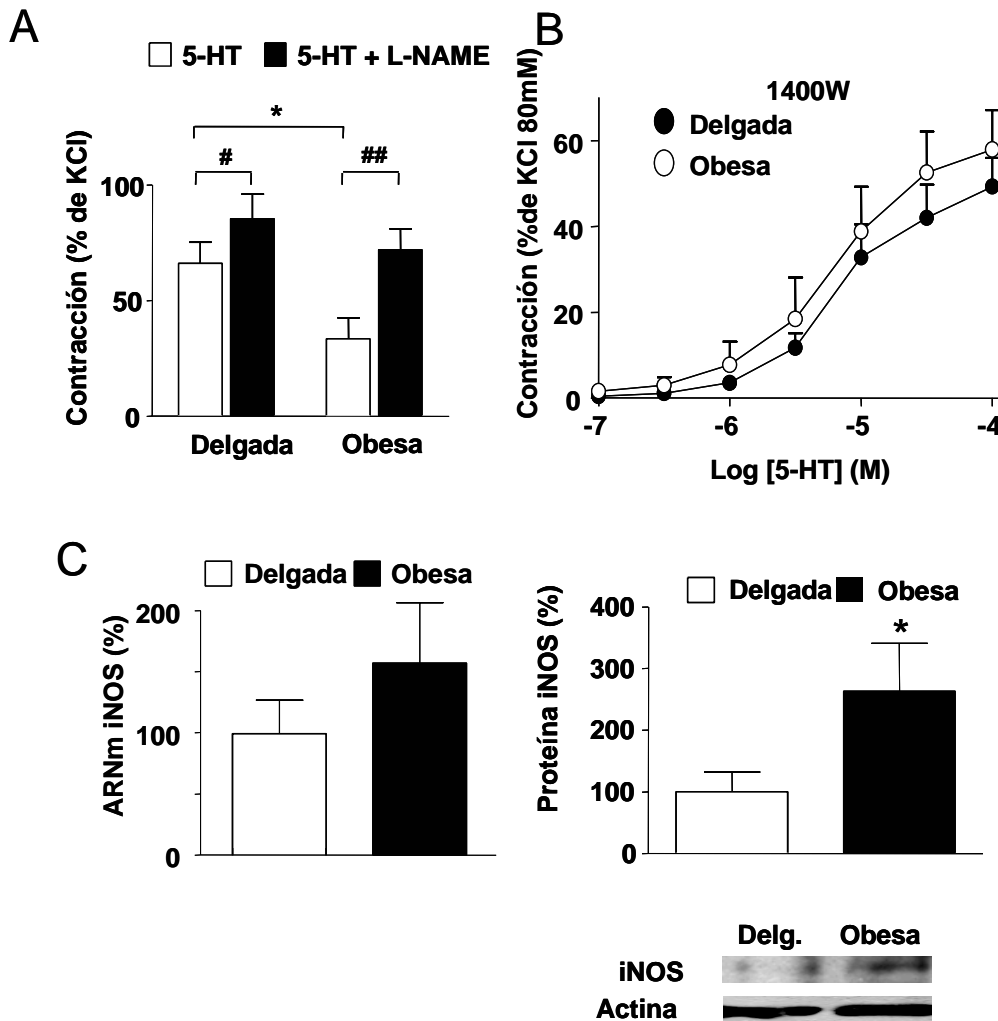


Figura R-22. (A) Contracción de AP de resistencia a 5-HT (10^{-4} M) y el efecto adicional de L-NAME (10^{-4} M) sobre la contracción de 5-HT, en Zucker obesas ($n=6$) y delgadas ($n=7$). (B) Curva concentración respuesta de AP de resistencia en presencia del inhibidor selectivo de iNOS, 1400W (10^{-5} M, $n=6$). (C) Valores medios de la expresión de ARNm ($n=6$) y (D) proteína de iNOS en AP de resistencia de Zucker obesas y delgadas ($n=6$ y 5, respectivamente) normalizados por los valores de α -actina. Los resultados están expresados como los valores medios \pm error estándar medio. * indica $P<0.05$ obesas vs delgadas en test no pareado. # y ## indican $P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente, antes y después del tratamiento con L-NAME en test pareado.

**3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENERADAS POR LA
DIABETES TIPO 1, LA HIPOXIA MODERADA Y SU
COMBINACIÓN.**

Se ha descrito en un modelo de ratas con predisposición a desarrollar HP (*fawn hooded rats*), que la exposición a un factor externo como la hipoxia, induce el desarrollo de HP de forma más grave y temprana (Sato *et al.*, 1992). Los resultados presentados hasta ahora muestran como en el modelo diabetes tipo 1, pero no en el de diabetes tipo 2, se producen una serie de cambios característicos de la HP. Sin embargo, la elevación de la PAP no ocurre hasta transcurridos 4 meses desde el establecimiento de la diabetes. En el apartado final de esta Tesis Doctoral, planteamos el estudio de los efectos de la diabetes tipo 1 en combinación con hipoxia moderada sobre diferentes parámetros relacionados con la HP. Se empleó para ello el modelo anteriormente descrito de diabetes tipo 1, en el que algunos animales fueron sometidos durante las 2 últimas semanas a hipoxia normobárica moderada.

En la tabla R-4 se muestran los valores medios de masa corporal para cada uno de los grupos experimentales al inicio del tratamiento en normoxia/hipoxia y en el día del experimento.

Tabla R-4. Valores de masa antes del reparto aleatorio en urnas de hipoxia/normoxia, y masa y glucemia al final del experimento. * y ** indican $P \leq 0.01$ y $P \leq 0.05$ comparado con los controles normoxia, respectivamente.

	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Glucemia (mg/ dL)
Control	373 ± 16	398 ± 18	237 ± 6
Control-hipoxia	366 ± 16	384 ± 17	219 ± 15
Diabéticas	258 ± 21*	258 ± 14*	535 ± 30 **
Diabéticas-hipoxia	241 ± 13*	242 ± 10*	573 ± 19 **

Como en los casos anteriores las ratas diabéticas sufrieron una pérdida significativa de masa independientemente de si se encontraban en hipoxia o en normoxia. Igualmente las ratas controles no se vieron afectadas por la hipoxia en su ganancia de masa.

3.1. FUNCIÓN ENDOTELIAL.

Se realizaron curvas a ACh en anillos de AP con el endotelio intacto, contraídos con fenilefrina (figura R-23). De nuevo, la diabetes tipo 1 produjo una reducción de eficacia de relajación de la ACh, sin modificar su potencia, independientemente de si se trataban de condiciones normóxicas o de condiciones hipóxicas (Tabla R-5). Por otro lado, la hipoxia no afectó a las respuestas a ACh en el grupo control ni en el diabético, en comparación con sus equivalentes normóxicos.

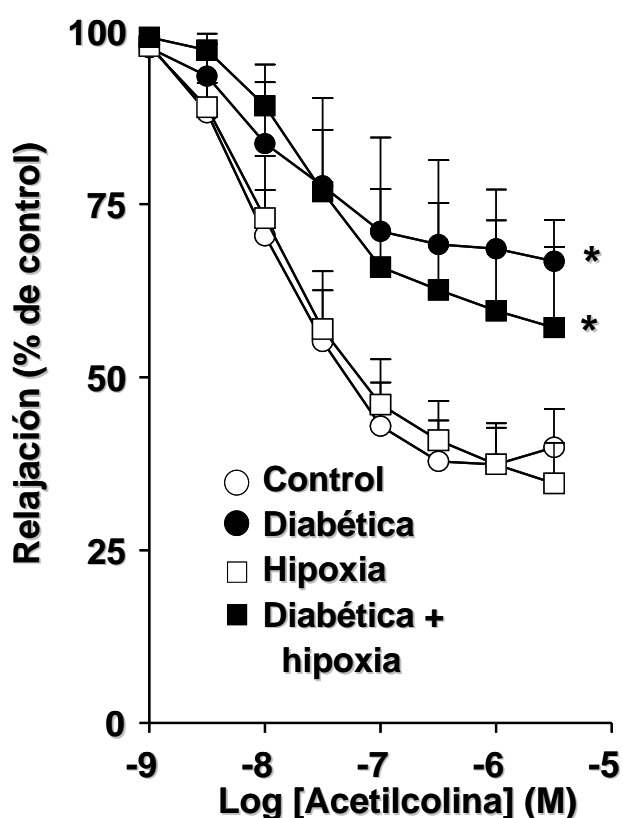


Figura R-23. Respuesta vasodilatadora a ACh de las AP de conductancias contraídas con fenilefrina 10^{-7} M. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m. ($n=5-6$). * indica $P < 0,05$ en los valores de E_{max} comparado con control normoxia.

Tabla R-5. Valores de E_{\max} y pD_2 para la relajación a ACh en condiciones de diabetes, la hipoxia moderada y la combinación de ambas. * indica $p \leq 0,05$ respecto al grupo control normoóxico ($n=5-6$).

	E_{\max} (% de KCl)	pD_2
Control	60 ± 6	$7,7 \pm 0,2$
Control-hipoxia	65 ± 6	$7,8 \pm 0,4$
Diabéticas	$40 \pm 9^*$	$7,3 \pm 0,3$
Diabéticas-hipoxia	$44 \pm 11^*$	$7,4 \pm 0,2$

3.2. CORRIENTES K_v .

Se registraron las corrientes K_v en CMLAP aisladas frescas de cada uno de los grupos. En consonancia con los datos de la literatura en los que la hipoxia crónica reducen la expresión y función de canales K_v (Platoshyn *et al.*, 2006), la densidad de corriente de las CMLAP de ratas controles y diabéticas expuestas a hipoxia estaba disminuida (figura R-24A). Sin embargo, no hubo diferencias en la densidad de corriente entre controles y diabéticas independientemente del tratamiento normóxico o hipóxico. El tamaño celular fue similar en todos los grupos, tal como indican los valores de la capacitancia.

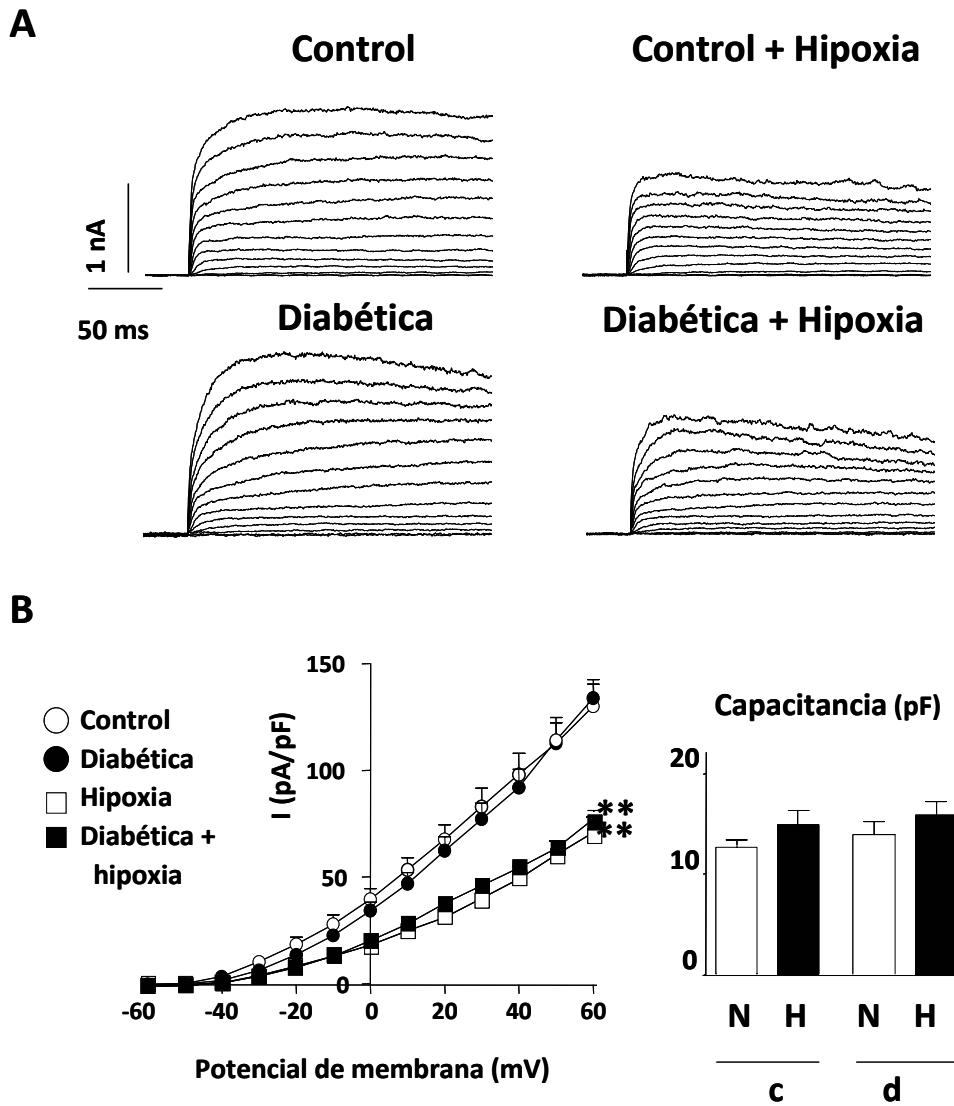


Figura R-24. (A) Trazos representativos de las corrientes K_v obtenidos al aplicar pulsos de -60 mV hasta +60 mV, desde un potencial de partida de -60 mV, en incrementos de 10 mV. (B) Relación corriente voltaje de los valores de corriente medidos al final de un pulso de 250 ms ($n=6-8$), y valores medios de capacitancia (N y H indican normoxia e hipoxia respectivamente). Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m.. ** indica $P < 0,01$ comparado normoxia.

3.3. EXPRESIÓN DE BMPR2.

El análisis de expresión proteica confirmó que tanto la diabetes como la hipoxia moderada, producen una disminución de BMPR2 (figura R-25). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la expresión del receptor en ratas diabéticas y controles en condiciones de hipoxia.

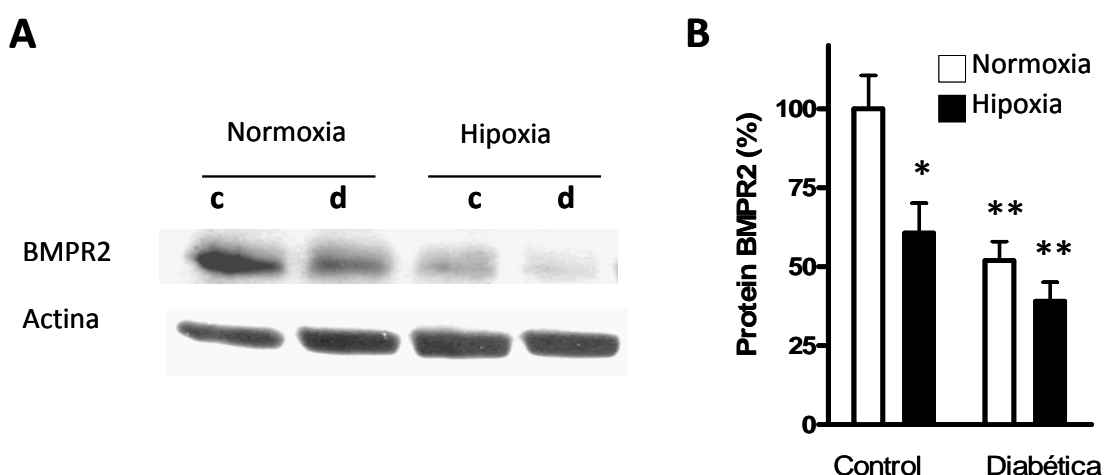


Figura R-25. (A) Imagen representativa de la expresión de BMPR2 en homogenizado de pulmón de ratas control y diabéticas en condiciones de normoxia e hipoxia. (B) Media de la expresión de BMPR2 corregidos por los valores de β -actina ($n=4-5$). * y **, indican $P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente, comparado con los valores del grupo control normoxia.

3.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.

3.4.1 Remodelado vascular del pulmón.

En rebanadas de pulmón se analizaron las arterias de resistencia con un tamaño comprendido entre 25-300 μm , clasificándolas en musculares, parcialmente musculares y no musculares.

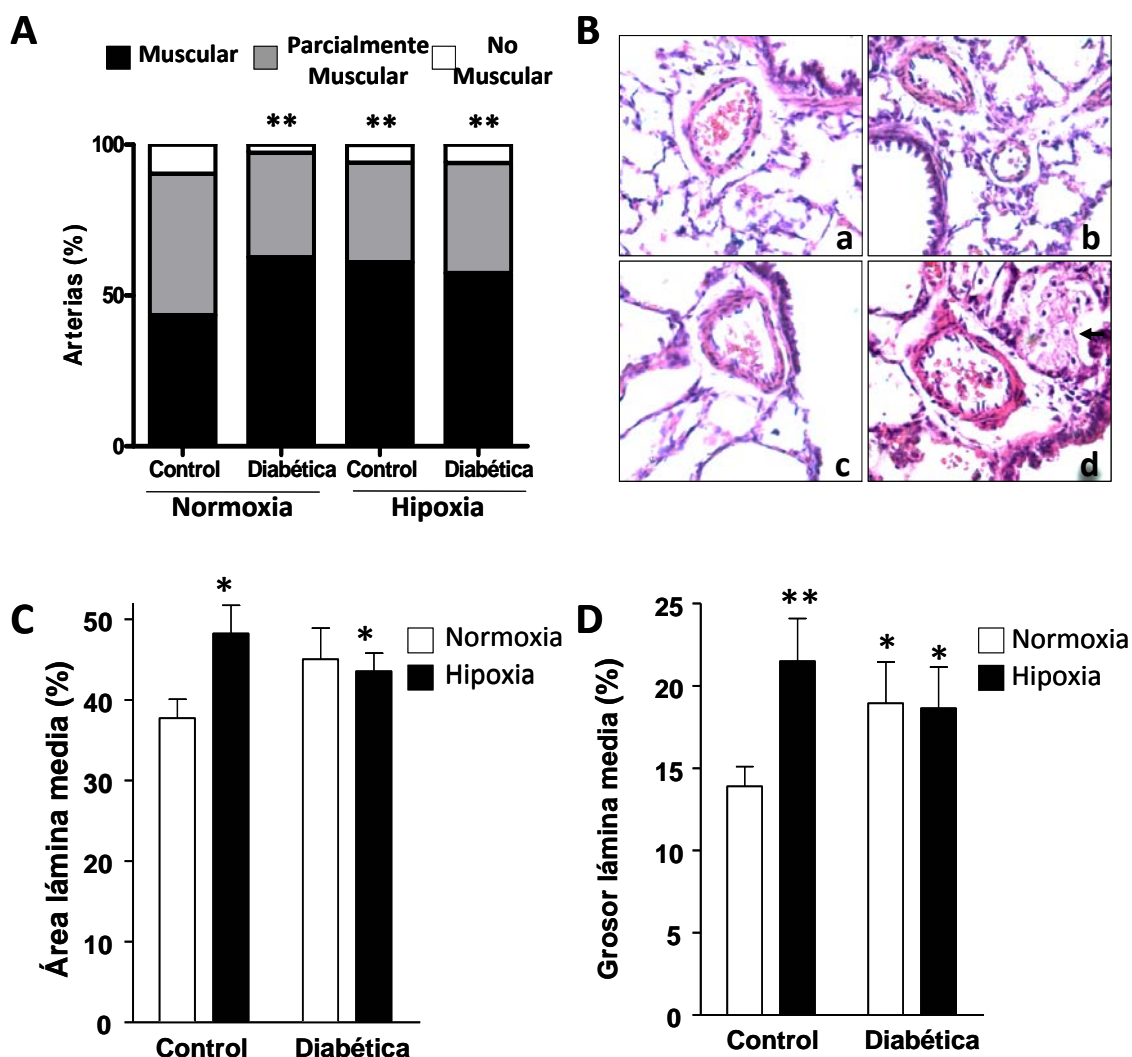


Figura R-26. Remodelado de las AP. (A) Porcentajes de AP musculares, parcialmente musculares (parc. muscular) y no musculares en cortes de pulmón de ratas controles, diabéticas expuestas a normoxia y a hipoxia moderada. Valores medios de 150-200 arterias analizadas de 5 animales de cada grupo. (B) Imagen representativa (400x) de los cortes de pulmón teñidos con hematoxilina/eosina, mostrando una arteria muscular de (a) control, (b) diabética, (c) control hipoxia y (d) diabética hipoxia. La flecha negra muestra el infiltrado de células inflamatorias presentes en un saco alveolar diabético. (C) Porcentaje del área de la lámina media y (D) porcentaje del grosor de la lámina media de arterias con un diámetro externo de 25-75 μm . Se midieron $n=18-25$ arterias de 3-4 ratas de cada grupo. * y **, indican $P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente, comparado con los valores del grupo control normoxia.

Tanto en la diabetes tipo 1 como en la hipoxia aumentó el porcentaje de arterias musculares, disminuyendo por otro lado el porcentaje de las parcialmente musculares y no musculares (figura R-26A). Asimismo, la diabetes y la hipoxia aumentaron el grosor porcentual de la capa media (figura R-26D), sin embargo no se encontró potenciación del efecto cuando ambas condiciones estaban presentes. Por otro lado, el área porcentual de la lámina media no se modificó por la diabetes, pero si por la hipoxia (figura R-26C). Cabe destacar, que el análisis histológico reveló la presencia de infiltrados inflamatorios en los espacios alveolares de las ratas diabéticas, independientemente de la exposición a hipoxia o a normoxia (observar la flecha en la figura R-26Bd).

3.4.2. Análisis de la naturaleza del infiltrado pulmonar en ratas diabéticas.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima productora de agentes oxidantes, presente en los fagosomas de células inflamatorias. A continuación se analizó la actividad MPO en homogenizados de pulmón como marcador de infiltrados pulmonares. En las muestras diabéticas la actividad MPO estaba aumentada significativamente con respecto a los controles (figura R-27A). Ninguna de las muestras de ratas hipóxicas mostró diferencias significativas con sus respectivos equivalentes normóxicos. Se realizaron experimentos de inmunohistoquímica incubando los cortes pulmonares con un anticuerpo anti-CD68, un marcador de macrófagos. El porcentaje de células positivas a CD68 fue significativamente mayor en las ratas diabéticas (figura R-27B). A diferencia de las muestras controles, el marcaje CD68 en las ratas diabéticas se vio incrementado en combinación con la hipoxia moderada.

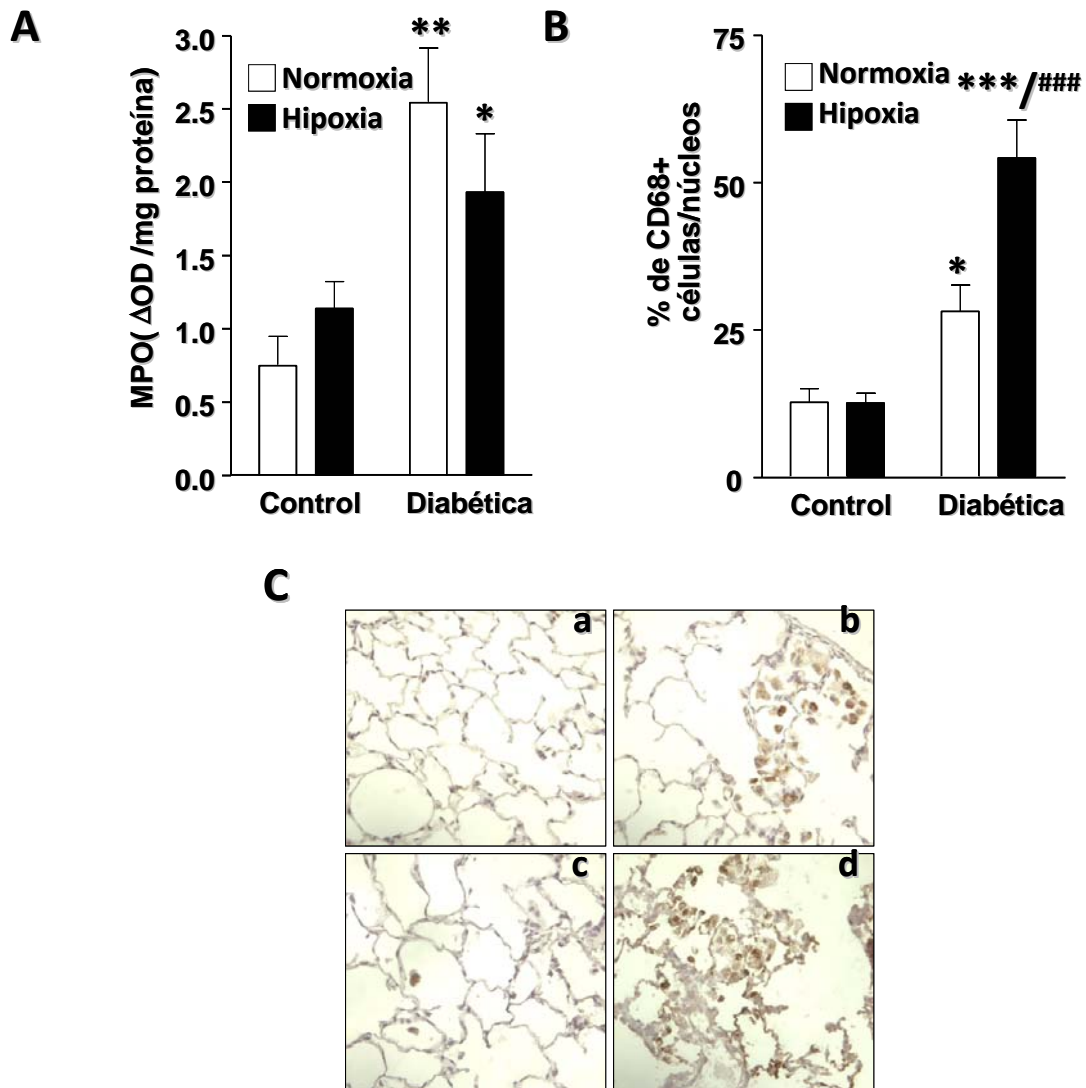


Figura R-27. (A) Valores de la mediada de la actividad de la MPO en homogenizados de pulmón, normalizados por los mg de proteína del homogenizado. (B) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células CD68+, normalizados por el número de núcleos teñidos con hematoxilina. (C) Imagen representativa (400x) de los cortes de pulmón marcados con CD68+ y teñidos con hematoxilina de (a) control, (b) diabética, (c) control hipoxia y (d) diabética hipoxia (n=6-9 secciones aleatoriamente seleccionadas de 3-4 ratas de cada grupo). *,** y *** indican $P<0.05$, $P<0.01$ y $P<0.001$ respectivamente comparado con control normoxia. ### indica $P<0.001$ comparado con diabética normoxia.

3.5. REMODELADO CARDIACO.

La combinación de diabetes e hipoxia produjo un aumento del ratio VD/MC (figura R-28B) pero no se produjeron cambios en los casos de las diabéticas normóxicas, ni de los controles hipóxicos. Por otro lado, la relación VI+S/MC no fue modificado ni por la diabetes ni por la hipoxia (figura R-28A). Finalmente el índice de Fulton aumentó en condiciones de hipoxia, tanto para las ratas controles como para las ratas diabéticas (figura R-28C).

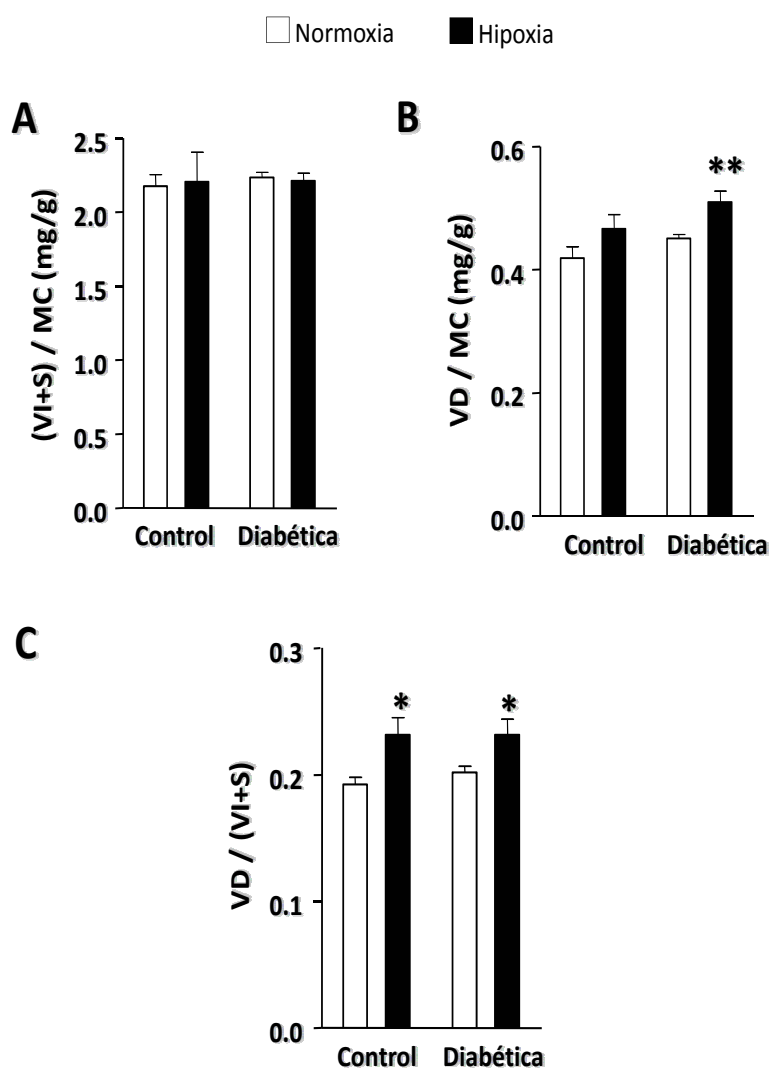
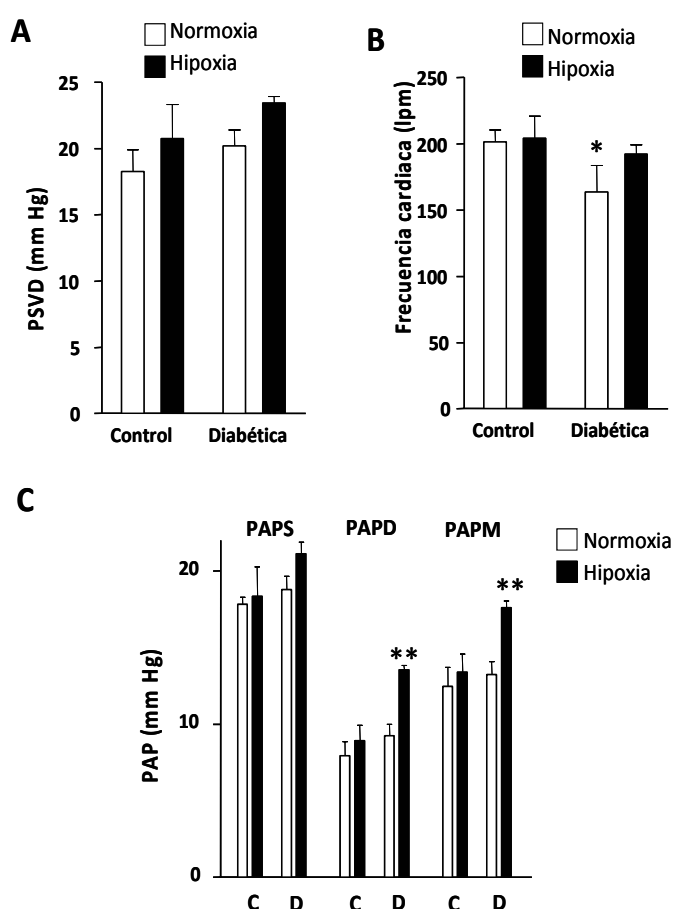


Figura R-28. (A) Relación de la masa del ventrículo izquierdo más el septo (VI+S) con la masa corporal (MC) de la rata. (B) Masa del ventrículo derecho (VD) relativo a la MC. (C) Valores del índice de Fulton [VD/(LV+S)]. Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m. ($n=5-7$). * y ** indican $P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente, comprado con los valores del grupo control normoxia.

3.6. PRESIÓN VENTRICULAR DERECHA, PRESIÓN ARTERIAL PULMONAR Y FRECUENCIA CARDIACA.

En ratas anestesiadas se midió la frecuencia cardiaca, y por medio de un transductor insertado a través del VD, se realizaron medidas de la PSVD, de la PAPS, PAPD y media PAMP. Las medidas de PSVD fueron similares en todos los grupos (figura R-29A). Las PAPS, PAPD y PAMP de las ratas control no se vieron afectadas por la hipoxia. Igualmente los valores de PAPS, PAPD y PAMP en condiciones de diabetes y normoxia fueron similares a los controles. Sin embargo, cabe destacar que tanto la PAPD como la PAMP sufrieron un significativo aumento en las ratas diabéticas sometidas a hipoxia moderada (figura R-29C). Por otro lado, la diabetes produjo una disminución de la frecuencia cardiaca, que se presentó sólo en condiciones de normoxia (figura R-29B).

Figura R-29. (A) Valores medios de la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD). (B) Frecuencias cardiacas registradas de ratas control y diabéticas, en normoxia e hipoxia. (C) Valores de la presión arterial pulmonar sistólica (PAPS), diastólica (PAPD) y media (PAMP) en diabéticas y controles (D y C, respectivamente) bajo condiciones de normoxia (barras blancas) o hipoxia (barras negras). Los resultados están expresados como los valores medios \pm e.e.m. * y ** indican $P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente, comparado con los valores del grupo control normoxia.



DISCUSIÓN

1. LA FUNCIÓN ENDOTELIAL DE LAS AP EN LA DIABETES TIPO 1.

El endotelio vascular produce diversas sustancias vasodilatadoras entre las que destacan el NO, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio, pero la contribución de estos factores al tono varia entre los diferentes tejidos vasculares (Lüscher *et al.*, 1992; Gardiner y Bennett, 1992). En las AP, el NO es el principal factor de la vasodilatación dependiente de endotelio en las AP (Lawrence *et al.*, 1998; Villamor *et al.*, 2002; Cogolludo *et al.*, 2007). Igualmente, en esta Tesis Doctoral encontramos la relajación inducida por ACh en AP controles y diabéticas tipo 1 se abolía en presencia de L-NAME, lo que indica el papel principal del NO. Para una correcta función de la vía del NO se debe producir la activación de la eNOS en las células endoteliales, la difusión del NO hasta la CMLV, la activación de la GC, el aumento de los niveles de GMPc y la activación de la PKG. A nivel sistémico, se ha descrito que la diabetes tipo 1 produce alteraciones sobre diferentes componentes de la vía del NO (Xu B. *et al.*, 2003; Zanetti *et al.*, 2005; Creager *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004). Por otro lado, los pacientes con HP tienen alteraciones en la síntesis, disponibilidad y/o actividad del NO, que determinan la marcada disfunción endotelial de las AP (Humbert *et al.*, 2004).

Los resultados presentados muestran la existencia de disfunción endotelial en las AP de las ratas diabéticas tipo 1, como refleja la menor respuesta a ACh. Igualmente, se ha comprobado que en diferentes arterias sistémicas de modelos de diabetes tipo 1 existe una disminución de la relajación inducida por ACh o carbacol (Utkan *et al.*, 1998; Kamata *et al.*, 1992; Creager *et al.*, 2003). Los efectos del donador de NO NPS, fueron similares en las AP de ambos grupos, lo que nos permite deducir que no existen alteraciones en la producción de GMPc, ni en los procesos posteriores. Además, la adición de L-NAME generó una respuesta contráctil significativamente menor en AP de las ratas

diabéticas tipo 1, lo que nos indica que existe una disminución en los niveles basales de NO en este modelo. Asimismo, la mayor respuesta contráctil a fenilefrina presentada por las AP de las ratas diabéticas tipo 1 podría ser debida a la disminución de los niveles basales de NO, aunque no hemos analizado la expresión de los receptores α adrenérgicos. En diferentes modelos de diabetes tipo 1, se han descrito tanto aumentos como disminuciones de eNOS a nivel sistémico (Nagareddy *et al.*, 2005; Mayhan *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2004; Zanetti *et al.*, 2005). En nuestros resultados la expresión de eNOS fue similar en ambos grupos, lo que permite descartar la disminución de la expresión de eNOS como causa de la disfunción endotelial. Sin embargo, ya que no disponemos de datos de la fosforilación de eNOS, no podemos descartar cambios en la actividad de esta enzima.

Aunque se ha demostrado que los niveles basales de ROS juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular, su producción excesiva está asociada con la HP y con la diabetes (Brownlee, 2001; Tschudi *et al.*, 1996; Coggins y Bloch, 2007; Perez-Vizcaíno *et al.*, 2010). El O_2^- es capaz de reaccionar rápidamente con el NO disminuyendo su disponibilidad, generando peroxinitrito que a su vez contribuyen al estrés oxidativo (Creager *et al.*, 2003; Giacco y Brownlee, 2010; Cohen y Tong, 2010). Nuestros resultados revelan una marcada tinción fluorescente por dihidroetidio en las AP de las ratas diabéticas tipo 1, lo que indica que existe una mayor producción de O_2^- respecto a las AP controles. Paradójicamente, la SOD-1, la principal enzima encargada de la detoxificación de O_2^- a nivel citoplasmático, muestra mayor expresión en las AP de las ratas diabéticas tipo 1. Igualmente, se han encontrado aumentos de la expresión de SOD-1 en las arterias mesentéricas en diabetes tipo 1 y en células endoteliales sometidas a estrés mecánico (Ding *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 1996; Rush *et al.*, 2003). Adicionalmente, la producción de peroxinitrito reduce la actividad de SOD-1 (White *et al.*, 2010). Estos resultados, unidos al hecho de que la reacción de combinación de O_2^- con NO es tres veces

más rápida que la dismutación del O_2^- por la SOD (Beckman *et al.*, 1996; Darley-USmar *et al.*, 1995), permiten deducir que el aumento de la expresión de SOD-1 tiene un carácter compensatorio. Por otro lado, el pretratamiento de las AP con SOD-1 restableció la respuesta vasodilatadora en las AP de diabéticas tipo 1, sin modificar la respuesta en las AP controles. Todos estos resultados indican que la disfunción endotelial encontrada en las AP de ratas diabéticas tipo 1, se debe a una disminución de la biodisponibilidad de NO, señalando al O_2^- como principal responsable.

La NADPH oxidasa es una de las principales enzimas productoras de O_2^- implicada en diferentes patologías que cursan con disfunción endotelial, como la hipertensión, arteriosclerosis, HP y diabetes (Briones y Touyz, 2010, Brennan *et al.*, 2003; Guzik *et al.*, 2002; Cohen y Tong, 2010). El estudio de la expresión de la subunidad reguladora de la NADPH oxidasa p47^{phox} reveló un aumento de dicha subunidad en las AP de las ratas diabéticas. Por otro lado, el pretratamiento de las AP con el inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina, restablece la función endotelial de las AP de ratas diabéticas tipo 1. La activación sostenida de la NADPH oxidasa está implicada en el aumento del estrés oxidativo asociado a la disfunción endotelial en diabetes e hiperglucemia. De hecho, la producción de ROS y la expresión p47^{phox} y de p22^{phox} aumenta en células endoteliales de ratón sometidas a hiperglucemia, mientras que el silenciamiento de p47^{phox} reduce la producción de O_2^- en CMLV (Ding *et al.*, 2007; Guzik *et al.*, 2002). De forma similar, en pulmones de pacientes con HP idiopática se ha descrito un aumento de la NADPH oxidasa y se ha asociado la actividad de esta enzima con el remodelado vascular pulmonar inducido por hipoxia (Mittal *et al.*, 2007; Sanders y Hoidal, 2007).

2. LA FUNCIÓN ENDOTELIAL DE LAS AP EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA.

La resistencia a la insulina asociada a la diabetes tipo 2 está relacionada con numerosas alteraciones cardiovasculares (Ginsberg, 2000; Villalba et al., 2009; Barbato et al., 2005). Además, existen diversos estudios que asocian las alteraciones vasculares con la disfunción endotelial en el modelo de ratas Zucker obesas empleado en esta Tesis Doctoral (Lu et al., 2010; Toblli et al., 2010; Agouni et al., 2009). Sin embargo, los resultados presentados no muestran diferencias en la respuesta a ACh en AP de resistencia ni de conductancia, comparado con sus controles. Asimismo, la expresión de eNOS tanto a nivel de ARNm como de proteína, fue similar en ratas Zucker obesas y delgadas. Estos resultados, junto a la respuesta similar a NPS en las AP de ambos grupos, determinan una correcta función endotelial y de la vía del NO en las AP. Por otro lado, se ha descrito que existe una disfunción endotelial en las arterias peneanas de ratas Zucker obesas, sin alteración de la función endotelial de las arterias coronarias (Villalba et al., 2009). Igualmente en el modelo de diabetes tipo 2 de ratas Gotokakizaki, se ha descrito que la función endotelial está intacta en arterias mesentéricas, mientras que las arterias cerebrales presentan disfunción endotelial (Sachidanandam et al., 2006). Por lo que en condiciones de resistencia a la insulina parece producirse una disfunción endotelial con selectividad tisular. Por otro lado, se ha descrito en las ratas Zucker obesas una pérdida de la respuesta vascular a ACh que aparece con el envejecimiento (entre las 25-30 semanas), a edades posteriores a las estudiadas en esta Tesis y que coincide con un aumento de la presión arterial (Subramanian et al., 2003). Sin embargo, no se han analizado los efectos de la resistencia a la insulina en las AP de este modelo en edades más avanzadas.

Existen diversas evidencias que relacionan tanto la hiperinsulinemia como la diabetes tipo 2 con un aumento del estrés oxidativo vascular

(Du Y. *et al*, 2003, Du X. *et al.*, 2006, Giacco y Brownlee, 2010). Igualmente, en los resultados presentados en AP de ratas diabéticas tipo 1 existe un aumento de la producción de ROS, que da lugar a una disfunción endotelial como consecuencia de la disminución de la disponibilidad de NO. Por otro lado, las ratas Zucker obesas presentaron una ligera tendencia al aumento de la glucemia y una correcta función endotelial. En el trabajo de Ding *et al.*, 2007 se combina la resistencia a la insulina con la hiperglucemia. En dicho trabajo, la inyección de estreptozotocina en el modelo de resistencia a la insulina de ratones apoE^{-/-} dio lugar a niveles de glucemia significativamente mayores que los discretos valores registrados en los ratones apoE^{-/-} sin estreptozotocina. Así, los ratones apoE^{-/-} estreptozotocina presentan un aumento significativo de los niveles vasculares de ROS y de la expresión de la subunidad de la NADPH oxidasa gp91^{phox}, comparado con los ratones apoE^{-/-} (Ding *et al.*, 2007). En conjunto, estos resultados señalan que las ROS generadas por la hiperglucemia, pero no las generadas por la hiperinsulinemia, son las responsables de la disfunción endotelial en las AP.

3. HIPERRESPUESTA A 5-HT DE LAS AP EN LA DIABETES TIPO 1.

La hiperrespuesta a 5-HT en AP de pequeño y gran calibre es una característica común en los modelos de HP inducida por hipoxia intermitente, monocrotalina o pontaje cardiopulmonar (Brown *et al.*, 1998; Rodat *et al.*, 2007, Sato *et al.*, 2000; Keegan *et al.*, 2001; Thomas y Wanstall, 2003). Igualmente, las AP intrapulmonares de las ratas diabéticas tipo 1 muestran una hiperrespuesta a 5-HT en la que no está implicada la liberación de factores vasoactivos derivados de endotelio, ya se mantiene en ausencia de endotelio y en presencia de L-NAME. Sin embargo, en ausencia de endotelio las diferencias en la contracción a 5-HT entre las AP de diabéticas tipo 1 y control tienden a ser menores,

debido a la disfunción endotelial descrita anteriormente. En el trabajo desarrollado por Gurney y Howarth (2009) se describe que las AP de ratas diabéticas tipo 1 muestran una menor respuesta a 5-HT. Sin embargo, las discrepancias con este trabajo pueden ser explicadas por la menor dosis de estreptozotocina empleada (60 mg/kg), así como un tiempo de exposición a la diabetes superior en el que pueden haberse desarrollado respuestas compensatorias.

En nuestros resultados, la potencia similar del antagonista selectivo por 5-HT_{2A} ketanserina indica que la respuesta está principalmente mediada por los receptores 5-HT_{2A} en ambos grupos, aunque no se puede descartar el papel de otros receptores como 5-HT_{1B} o 5-HT_{2B} (MacLean *et al.*, 1996 y 2000; Launay *et al.*, 2002; Esteve *et al.*, 2007). La expresión de los receptores 5-HT_{2A} es significativamente mayor en los pulmones de las ratas diabéticas tipo 1 comparado con los controles. Asimismo, se ha descrito que la hiperrespuesta a 5-HT que presentan las AP de ratas con HP es debida a un aumento de la contracción mediada por 5-HT_{2A} (MacLean *et al.*, 1996). Sin embargo, en presencia de fármacos inhibidores de COX o antioxidantes se previene completamente la hiperrespuesta a 5-HT, por lo que el aumento de la expresión de 5-HT_{2A} no parece explicar el aumento de contracción a 5-HT observado en las AP diabéticas tipo 1. La sobreexpresión de 5-HT_{2A} podría ser relevante a nivel proliferativo. Así, se ha descrito que la activación de los receptores 5-HT_{2A} inicia procesos proliferativos en las CMLV de AP por medio de la activación de la fosfolipasa D (Liu y Fanburg, 2008). La causa principal de la hiperrespuesta a 5-HT parece ser debida a las alteraciones generadas por la hiperglucemia, ya que en las ratas diabéticas tipo 1 tratadas con insulina se reduce la hiperrespuesta a 5-HT en las AP.

Algunos de los metabolitos del AA contribuyen al desarrollo de alteraciones vasculares a pulmonares, pero la interacción entre ellos es compleja, pudiendo ser sinérgica o antagonística. Los productos de la COX, especialmente el TXA₂, contribuyen en la fase temprana del

desarrollo de HP inducido por sepsis o por $\text{TNF}\alpha$ (Barnes y Liu, 1995). Además, los niveles de expresión de COX-2 están aumentados en los pulmones de ratas con HP inducida por hipoxia (Chida y Voelkel., 1996; Pidgeon *et al.*, 2004) o por un alto flujo sanguíneo pulmonar (Sato *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2005) y en células de músculo liso de AP humanas en condiciones hipóxicas (Yang *et al.*, 2002). Por otro lado, se han descrito alteraciones en el equilibrio de $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ en pacientes con HP idiopática y secundaria, con niveles elevados de TXA_2 y disminuidos de PGI_2 (Christman *et al.*, 1992). Los resultados en AP de ratas diabéticas tipo 1 obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran un aumento de la expresión de COX-2. Asimismo, los pulmones de ratas tratadas con estreptozotoina tienen una producción elevada de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 cuando se añade AA de forma exógena (Watts *et al.*, 1982). Sin embargo, no está claro si el papel de COX-2 es beneficioso o perjudicial en la HP, ya que se ha descrito que la inhibición de COX-2 por celecoxib tiene efectos beneficiosos frente al desarrollo de HP inducida por monocrotalina (Rakotoniaina *et al.*, 2008), mientras que el aumento de expresión y actividad de COX-2 en arterias mesentéricas en diabetes tipo 1 mejora la función endotelial (Nacci *et al.*, 2009). Por otro lado, la HP inducida por hipoxia está exacerbada en animales knockout para COX-2 (Fredenburgh *et al.*, 2008, Cathcart *et al.*, 2008). En nuestros experimentos los inhibidores de COX reducen la hiperrespuesta a 5-HT encontrada en las AP de ratas diabéticas tipo 1. Además, la inhibición de COX-2 redujo la contracción máxima a 5-HT en las AP de ratas diabéticas tipo 1.

Posteriormente, se crearon unas condiciones con la intención de mimetizar las condiciones diabéticas *in vitro*. Para ello se empleó un donador no enzimático de O_2^- (pirogallol), y un análogo del TXA_2 (U46619), uno de los principales metabolitos de la COX-2 con actividad vasoconstrictora cuyos niveles están aumentados en diversas formas de HP (Christman *et al.*, 1992). La adición del análogo del TXA_2 U46619 en AP controles reproduce parcialmente los efectos de la diabetes tipo 1 en la respuesta de las AP a 5-HT, sugiriendo la participación de algún

producto derivado de COX-2 en la hiperrespuesta a 5-HT observado en la diabetes tipo 1. Así, la inhibición aguda de COX-2 previene la hiperrespuesta a 5-HT en las AP de ratas diabéticas tipo 1 en nuestros experimentos, del mismo modo que la previene en diversos modelos de HP (Thomas *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2000). Datos similares de hiperrespuesta a 5-HT dependiente de COX-2 se han descrito en arterias sistémicas de modelos animales de diabetes tipo 1 y tipo 2 (Jarajapu *et al.*, 2008, Shi y Vanhoutte., 2008). Además, en el trabajo descrito por Shi y Vanhoutte (2008), la hiperrespuesta a 5-HT se previene con inhibidores de COX-2 y con antioxidantes en arterias femorales sin endotelio de ratas diabéticas tipo 1. En el mismo trabajo la inhibición del receptor TP previene la hiperrespuesta a 5-HT inducida por ROS en arterias femorales de ratas diabéticas tipo 1, sugiriendo que el metabolito de COX responsable actúa a través del receptor TP.

El estrés oxidativo vascular originado por la diabetes ha sido ampliamente descrito (Creager *et al.*, 2003; Giacco y Brownlee, 2010; Cohen y Tong, 2010). Igualmente, en esta Tesis Doctoral se ha observado un aumento de ROS y de la expresión de p47^{phox} en las AP de ratas diabéticas tipo 1. La inhibición de la NADPH oxidasa o la disminución de ROS mediante SOD previenen la hiperrespuesta a 5-HT de las AP de ratas diabéticas tipo 1, sin afectar a las respuestas en las AP controles. Por otro lado, la adición exógena de un donador de O₂⁻, el pirogalol, aumenta la eficacia de contracción de la 5-HT en AP de ratas controles. La relación de COX-2 y de las especies reactivas de oxígeno es compleja, ya que la COX-2 puede generar O₂⁻ de forma directa o indirecta a través de la activación de la NADPH oxidasa por medio del TXA₂ (Shi y Vanhoutte, 2008, Cogolludo *et al.*, 2006). Por otro lado, la COX-2 puede ser activada mediante la producción de ROS (Garcia-Redondo *et al.*, 2009). En las AP controles la indometacina previene los efectos de hiperrespuesta a 5-HT inducidos por pirogalol, mientras que la apocinina no tiene ningún efecto sobre la potenciación del efecto de 5-HT inducido por U46619. Todos los resultados discutidos en este

apartado sugieren que las ROS generadas por la NADPH oxidasa activan la COX-2 contribuyendo a la hiperrespuesta a 5-HT observada AP de ratas diabéticas tipo 1. Además estos resultados están apoyados por el aumento de la expresión de las proteínas 5-HT_{2A}, p47^{phox}, COX-2 implicadas en esta vía.

4. RESPUESTA A VASOCONSTRICTORES DE LAS AP EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA.

Numerosos estudios de las alteraciones inducidas por la resistencia a la insulina en diferentes tejidos vasculares, han descrito la existencia tanto de aumentos (Villalba *et al.*, 2009; Ouchi *et al.*, 1996; Harker *et al.*, 1993; Zemel *et al.*, 1991; Okon *et al.*, 2005; Stepp y Frisbee, 2002), como disminución (Turner y White, 1991; Kam *et al.*, 1996; Cox y Kikta, 1992, Zemel *et al.*, 1991) de la respuesta a vasoconstrictores. Nuestros resultados muestran una reactividad disminuida a hipoxia, fenilefrina, KCl y 5-HT en las AP de resistencia de las ratas Zucker obesas. Sin embargo, la respuesta de las AP de conductancia fue similar entre Zucker obesas y control. Asimismo, la expresión de los receptores 5-HT_{2A} es similar en los pulmones de ratas Zucker obesas y delgadas. Se ha propuesto que la respuesta reducida a agentes vasoconstrictores puede compensar la disfunción endotelial en condiciones de diabetes tipo 2 (Romanko *et al.*, 2005). Sin embargo, esto no permite explicar la hiporrespuesta en las AP de Zucker obesas, ya que no presentan disfunción endotelial.

La iNOS es una enzima clave en alteraciones inflamatorias como la diabetes, la resistencia a la insulina y la obesidad. De hecho se ha establecido que la iNOS contribuye por medio del estrés nitrosativo al desarrollo de la resistencia a la insulina (Sugita *et al.*, 2005; Yasukawa *et al.*, 2005) y que su deficiencia previene el desarrollo de resistencia a la insulina en músculo esquelético de ratones con dieta alta en grasa

(Fujimoto *et al.*, 2005). Por otro lado, la iNOS está implicada en alteraciones de la contractilidad cardíaca y en las complicaciones vasculares derivadas de la resistencia a la insulina (Song *et al.*, 2008; Gunnnett *et al.*, 2003; Noronha *et al.*, 2005). En los resultados presentados, la inhibición inespecífica de NOS mediante L-NAME aumentó la contracción inducida por 5-HT en AP de ratas Zucker obesas y delgadas. Sin embargo, el incremento de contracción inducido por L-NAME fue mayor en las AP de Zucker obesas, indicando que en ellas hay una mayor producción de NO que genera hiporrespuesta a los agentes vasoconstrictores. Así, la incubación con el inhibidor selectivo de iNOS 1400W normalizó la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en las AP de Zucker obesas, sin modificar la respuesta en las delgadas. Estos resultados indicaron que la iNOS es la fuente de NO responsable de la menor respuesta contráctil en las AP de las Zucker obesas. La iNOS es una enzima productora de NO de forma independiente de Ca^{2+} , cuya expresión puede ser inducida en gran número de tejidos y células por diferentes agentes proinflamatorios. La regulación de la producción de NO por la iNOS se realiza a nivel transcripcional, de modo que una vez sintetizada genera grandes cantidades de NO hasta su degradación (Pautz *et al.*, 2010). Como muestran nuestros datos, la expresión proteica de iNOS estaba aumentada en las AP de ratas Zucker obesas. Del mismo modo, se ha descrito un aumento de la expresión de iNOS en aorta, en tejido adiposo y en corazón de ratas Zucker obesas, así como en otros modelos de resistencia a la insulina (Song D. *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2008; Noronha *et al.*, 2005). Del mismo modo, en la intoxicación con el herbicida paraquat, que genera daño pulmonar agudo e HP, se ha observado un aumento la expresión de iNOS e hiporrespuesta a vasoconstrictores en las AP (Zocrato *et al.*, 2010). La sobreexpresión de iNOS está asociada con una disfunción endotelial debido a la depleción de cofactores de la eNOS y a un aumento de producción de peroxinitrito (Gunnnett *et al.*, 2005). Sin embargo, en aquellos casos en los que se manifiesta disfunción endotelial mediada por iNOS, la expresión de iNOS pueden llegar a aumentar hasta 10

veces. En los resultados de esta Tesis Doctoral, el discreto aumento de iNOS es suficiente para disminuir la respuesta a los vasoconstrictores, pero insuficiente para generar disfunción endotelial en las AP de las ratas Zucker obesas.

5. MARCADORES DE HP EN LA DIABETES TIPO 1: REMODELADO, K_v , Y BMPR2.

En muchos casos de HP heredable y de HP idiopática hay mutaciones en el gen que codifica para BMPR2. Adicionalmente, la expresión de BMPR2 está disminuida en pulmones de pacientes con HP idiopática y secundaria (Atkinson *et al.*, 2002) o en pulmones de ratas con HP inducida por hipoxia o monocrotalina (Morty *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2006). En los resultados presentados, los pulmones de ratas diabéticas tipo 1 presentan una disminución de la expresión del receptor BMPR2. Del mismo modo se ha descrito la disminución de la expresión de BMPR2 en riñones de ratas diabéticas tipo 1 (Wang *et al.*, 2001, Yeh *et al.*, 2009). La HP es la única patología conocida asociada a alteraciones en BMPR2. De hecho, el cambio en la expresión de BMPR2 parece preceder al desarrollo de HP, ya que se revela en las ratas diabéticas tipo 1 incluso con valores de PSVD e índice de Fúlton similares a los de los controles. Nuestros datos están en consonancia con el concepto de que mutaciones o disminución de la expresión de BMPR2 son factores que predisponen, pero que no son suficientes para el desarrollo de HP, mientras que la exposición a estímulos adicionales como la elevada altitud, hipoxia o la sobreexpresión de 5-lipoxigenasa inducen el desarrollo de HP (Song *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2008; MacLean y Dempsie, 2009). De igual forma, la HP no es evidente en los ratones BMPR2^{+/-} pero se desarrolla después de la infusión con 5-HT y se exacerba bajo condiciones de hipoxia (Long *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, la sobreexpresión de 5-HT_{2A} descrita en las ratas diabéticas tipo 1 puede ser relevante a nivel proliferativo, ya que se ha descrito que la activación de los receptores 5-HT_{2A} inicia procesos proliferativos en las CMLV de AP (Liu y Fanburg, 2008). Además, se ha descrito un aumento de la expresión de los receptores de 5-HT en AP de humanos y modelos animales con HP, así la activación de los receptores de 5-HT podría ser un factor limitante en el desarrollo de HP (Launay *et al.*, 2002; Esteve *et al.*, 2007). La 5-HT estimula procesos proliferativos a través de ERK, mientras que la activación de los receptores BMPR2 da lugar a efectos antiproliferativos y apoptóticos. Además, la 5-HT es capaz de inhibir la vía Smad antiproliferativa de BMPR2, por lo que un exceso en la señalización de 5-HT y disminución de BMPR2 desplaza el equilibrio hacia procesos proliferativos (figura D-1) (MacLean y Dempsie, 2009). De hecho, en los pulmones de ratas diabéticas tipo 1 el porcentaje de arterias muscularizadas tiende a aumentar en el primer grupo de experimentos, y muestran un significativo aumento del porcentaje de arterias musculares tras incrementar la población de estudio en los experimentos finales de esta Tesis Doctoral.

Se ha descrito tanto en humanos como en modelos de HP una reducción de las corrientes K_V, así como disminución de la expresión de K_V1.5, K_V3.1 y K_V2.1 (Long *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 1998; Guignabert *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2006). El análisis electrofisiológico de las CMLV de AP no mostró cambios significativos en la densidad de corriente K_V entre las ratas controles y las diabéticas tipo 1. Del mismo modo la expresión de canales K_V1.5 fue similar en ambos grupos. Esto es consistente con los resultados encontrados en el modelo de predisposición genética a HP de ratas *fawn hooded* a las 20 semanas de edad (prehipertensos), en los que no hay cambios significativos en la densidad de corriente ni en la expresión de K_V1.5 antes de desarrollar HP (Bonnet *et al.*, 2006).

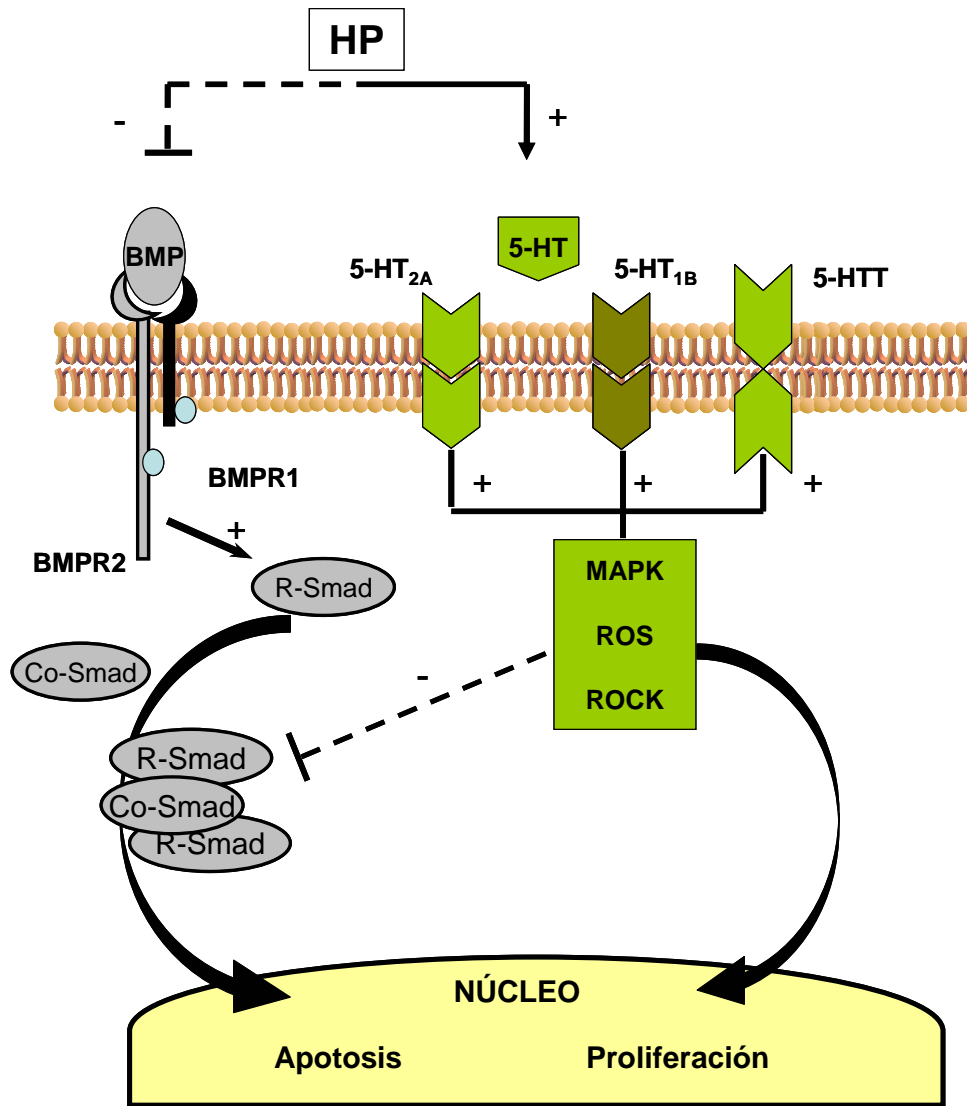


Figura D-1. Interacción entre la señalización intracelular de BMPR2 y 5-HT en la HP. La 5-HT a través de sus receptores (5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}) o su transportador (5-HTT) inicia cascadas de señalización intracelular que inhiben la vía proliferativa de las Smad iniciada por BMP. Modificado de MacLean y Dempsey, 2009.

6. MARCADORES DE HP EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA: REMODELADO, K_v Y BMPR2.

El aumento mantenido de la PAP tiene como resultado final una hipertrofia cardiaca derecha, por ello usamos el grosor de la pared ventricular derecha como parámetro indirecto de la PAP. En ratones apoE^{-/-} con dieta alta en grasa se ha descrito un aumento del índice Fulton, indicando la existencia de hipertrofia ventricular derecha en este modelo de resistencia a la insulina (Hasmann *et al.*, 2007). Sin embargo, en los resultados de esta Tesis Doctoral las ratas Zucker obesas no muestran engrosamiento de la pared ventricular comparado con las Zucker delgadas.

Se ha sugerido la participación de diferentes proteínas BMP y sus receptores en la adipogénesis y la obesidad, mostrando aumentos de la expresión de BMPR2 en el tejido adiposo visceral de humanos obesos (Schleinitz *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha descrito que la expresión vascular de BMPR2 puede estar aumentada en fases tempranas de la diabetes (Nett *et al.*, 2006). A diferencia de los resultados encontrados en las ratas diabéticas tipo 1 y en diferentes modelos de HP, la expresión del receptor BMPR2 fue similar en los pulmones de las ratas Zucker obesas y delgadas.

En el modelo de ratones diabéticos tipo 2 se ha descrito una reducción de la densidad de corriente en miocitos ventriculares, atribuyendo esta menor densidad de corriente a la resistencia a la insulina (Shimoni *et al.*, 2004). La reducción en la densidad de corriente K_v implica despolarización celular y activación de procesos proliferativos en CMLV (Yuan *et al.*, 1998; Firth *et al.*, 2011). La expresión de $K_v1.5$, tanto a nivel de ARNm como de proteína, fue similar en los pulmones de las ratas Zucker obesas y controles. Igualmente, el análisis

electrofisiológico no mostró diferencias en la densidad de corriente K_V , ni en la sensibilidad aguda a la hipoxia de las corrientes registradas en las CMLV de AP de ambos grupos. Asimismo, no se observaron indicios de hipertrofia celular como demuestran los valores de capacitancia similares en ambos grupos.

7. DIBETES TIPO 1 E HIPOXIA MODERADA.

Existen modelos animales con predisposición a la HP, que desarrollan un aumento de la PAP cuando son sometidos a otro factor de riesgo. Así los ratones $BMPR2^{+/-}$ y las ratas *fawn hooded* desarrollan HP tras la infusión con 5-HT o tras la exposición a hipoxia, respectivamente (Long *et al.*, 2006; Nagaoka *et al.*, 2001). Igualmente, se ha estudiado la relación de las mutaciones en el receptor BMPR2 y la HP, pero aún no está claro por qué sólo un 20% de los pacientes con mutaciones en BMPR2 desarrollan HP. Algunos autores describen la necesidad de lo que han denominado “*second-hit*” para el desarrollo de la HP (MacLean y Dempsie, 2010). Es decir, es necesaria la aparición de un segundo factor de riesgo. Así, la regulación epigenética y los factores ambientales pueden desencadenar HP en condiciones en las que existen alteraciones que predisponen a su desarrollo (Rexhaj *et al.*, 2011). De esta manera, en la raza de gallinas *Broiler fowl*, factores ambientales como la exposición a bajas temperaturas, la dieta o aumento en la ganancia de peso determinan la prevalencia de HP (Wideman *et al.*, 2011; Julian *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2011). Así, se ha descrito que la restricción en la dieta materna o la preeclamsia, generan una descendencia que desarrolla una HP más grave (Rexhaj *et al.*, 2011; Jayet *et al.*, 2010).

En su conjunto, los cambios encontrados en la reactividad de AP y en la expresión proteica pulmonar de las ratas diabéticas tipo 1, establecen la relación molecular y funcional de la diabetes tipo 1 y la HP. Sin

embargo, a las 6 semanas tras la inducción de la diabetes tipo 1, no se encontraron evidencias directas de la elevación de la PAP. Por ese motivo, en la parte final de esta Tesis Doctoral, nos propusimos estudiar el desarrollo de HP en el modelo de diabetes tipo 1 en combinación con hipoxia moderada (14% de O₂, equivalente a 3700 m de altitud) en ratas Wistar-kyoto, las cuales han demostrado presentar mayor sensibilidad al desarrollo de alteraciones pulmonares que la cepa *Sprague-Dawley* (Bochnowicz *et al.*, 2000).

En esta segunda batería de experimentos la diabetes tipo 1 indujo disfunción endotelial, como habíamos encontrado previamente. Sin embargo, la hipoxia no generó disfunción endotelial en las AP ni potenció la generada por la diabetes tipo 1. Se ha demostrado que la hipoxia es capaz de generar disfunción endotelial asociada a la producción de O₂⁻ (Mam *et al.*, 2009). Esta diferencia puede ser debida a que en nuestras condiciones experimentales empleamos una hipoxia moderada.

En numerosos artículos se describe la importancia del componente inflamatorio en las alteraciones asociadas a la enfermedad diabética (Creager *et al.*, 2003; Yamagishi *et al.*, 2011; Brownlee, 2005). Por otro lado, las evidencias del reclutamiento de células inflamatorias, principalmente monocitos y macrófagos, a nivel pulmonar en humanos y modelos animales de HP sugieren la participación de procesos inflamatorios en el desarrollo de la patología de la HP (Frid *et al.*, 2006; Perros *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Vergadi *et al.*, 2011). En los resultados presentados la diabetes tipo 1 da lugar a procesos inflamatorios pulmonares, como se demuestra por el aumento de la actividad mieloperoxidasa y el aumento de células positivas a CD68, correspondientes a macrófagos. Se ha descrito que la hipoxia genera reclutamiento de células inflamatorias a nivel pulmonar (Frid *et al.*, 2006; Vergadi *et al.*, 2011). Sin embargo, no sucede lo mismo bajo nuestras condiciones de hipoxia moderada. La presencia de estas

células inflamatorias está significativamente aumentada en la combinación de diabetes tipo 1 e hipoxia moderada. El hecho de que existan infiltrados de células inflamatorias en los pulmones de las ratas diabéticas tipo 1 sugiere que es un proceso previo al desarrollo de HP, apoyando los resultados que se describen en el trabajo de Vergadi *et al.*, 2011.

La reducción de la expresión pulmonar de BMPR2 se da tanto en la diabetes tipo 1 como en la hipoxia, pero esta reducción no se potencia significativamente al combinarse ambos factores. Recientemente se ha descrito el papel del receptor BMPR2 en el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial en las AP, impidiendo la trans migración de células inflamatorias (Burton *et al.*, 2011). Es posible que la disminución de BMPR2 esté contribuyendo a la aparición de infiltrado inflamatorio en los pulmones de ratas diabéticas. Sin embargo, esto no explicaría la ausencia de infiltrados inflamatorios en las ratas controles bajo condiciones de hipoxia moderada, lo que sugiere que es necesaria la contribución de otro factor presente en la diabetes. La reducción de la expresión de BMPR2 desplaza el equilibrio celular hacia procesos proliferativos (Chan y Loscalzo, 2008), lo que explica el aumento del porcentaje de arterias musculares a nivel pulmonar bajo condiciones de hipoxia y de diabetes. Cuando se combinan las condiciones de diabetes e hipoxia no existe potenciación del remodelado pulmonar, de la misma forma que no existe potenciación en la disminución de la expresión de BMPR2.

La hipoxia bloquea numerosos canales de potasio y disminuye la densidad de corriente en las CMLV de AP (Frazziano *et al.*, 2011; Cogolludo *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 1998, Coppock *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2004). Así, bajo las condiciones de hipoxia moderada se registraron menores densidades de corriente en CMLV de AP, sin verse afectadas por la diabetes tipo 1. Como se ha descrito anteriormente una disminución o bloqueo de canales K_v da lugar a procesos proliferativos y

por tanto remodelado. Sin embargo, la diabetes tipo 1 no produce cambios significativos en la densidad de corriente pero hay un aumento del porcentaje de arterias musculares.

En los resultados se muestra que la exposición del modelo de diabetes tipo 1 a una hipoxia moderada genera un aumento de la PAP media y por tanto al desarrollo de HP. Un estudio reciente determina que pequeños aumentos de la PAP, incluso dentro del rango fisiológico, establecen un impacto negativo sobre la supervivencia, independientemente de otros factores de riesgo conocidos (Lam et al., 2009). De esta manera, la elevación de la PAP puede contribuir al aumento de los eventos cardiovasculares y disminución de la supervivencia en los pacientes diabéticos.

8. DISCUSIÓN GENERAL Y FUTURAS INVESTIGACIONES.

Las alteraciones vasculares sistémicas asociadas a la diabetes han sido estudiadas y descritas ampliamente. A lo largo de esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de las posibles alteraciones diabéticas a nivel pulmonar asociadas con la HP, un aspecto que hasta la fecha no había sido estudiado suficientemente. En el modelo de diabetes tipo 1 inducido por estreptozotocina se producen alteraciones a nivel pulmonar asociadas con la génesis de la HP, tales como la disfunción endotelial de las AP, aumento del estrés oxidativo, hiperrespuesta a 5-HT en las AP, disminución de la expresión pulmonar de BMPR2, infiltración de células inflamatorias y remodelado vascular pulmonar. Todas estas alteraciones establecen la base sobre la que un factor de riesgo adicional puede desencadenar la elevación de la PAP y el establecimiento de la HP. En el modelo de ratas Zucker obesas hemos descrito una menor respuesta contráctil de las AP a diferentes agentes vasoconstrictores debido a un aumento de la expresión de iNOS, sin que se observaran cambios en la expresión de BMPR2 ni en la función endotelial de las AP. Sin embargo, se ha descrito un aumento de la prevalencia de HP en los pacientes diabéticos tipo 2 (Movahed *et al.*, 2005). La hiperglucemia parece ser el principal factor de las alteraciones cardiovasculares encontradas en la diabetes tipo 1 o tipo 2. Así, los pacientes con una tolerancia a la glucosa alterada presentan un riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares similar al de los pacientes diabéticos (Qiao *et al.*, 2002 y 2003). En el modelo de diabetes tipo 1, la estreptozotocina da lugar a la destrucción de las células β pancreáticas, con una deficiencia total de la secreción de insulina, y por tanto unos niveles de glucemia muy elevados. En nuestros resultados, el tratamiento con insulina reduce la disfunción endotelial y la hiperrespuesta de las AP a 5-HT en este modelo. Por otro lado, las ratas Zucker obesas presentaron hiperinsulinemia con una ligera tendencia a la hiperglucemia que no fue estadísticamente significativa. Los datos sugieren que la hiperglucemia es la responsable de las alteraciones

asociadas a la HP encontradas en las ratas diabéticas tipo 1, mientras que los cambios observados en las AP de las ratas Zucker obesas corresponden a las alteraciones propias de un estado previo a establecimiento de la diabetes tipo 2.

Ante una disminución de los niveles de O₂, las células activan numerosas vías imprescindibles para la adaptación a las condiciones hipóxicas. La mayoría de ellas están reguladas por la unión de HIF-1 a los elementos de respuesta a la hipoxia (*hypoxia response elements*, HRE), y esta regulación depende de la capacidad de las células para detectar la privación de O₂ como una señal para aumentar la transcripción y estabilidad de HIF-1. Los cambios de expresión inducidos por HIF-1 activan la proliferación, la angiogénesis, la diferenciación celular y el remodelado de matriz (Bento y Pereira, 2011). Un cambio muy interesante inducido por la hipoxia a través de HIF-1 α es el “efecto Pasteur”, que consiste en un aumento de expresión de enzimas glucolíticas que dirigen un cambio metabólico de una respiración mitocondrial (dependiente de O₂) a la glucólisis. De forma similar, la hiperglucemia es capaz de generar cambios epigenéticos, regulando la expresión de genes (Miao *et al.*, 2004; El-Osta *et al.*, 2008). En el trabajo de Isoe *et al.*, 2010 se describe la existencia de un elemento de respuesta a carbohidratos (*carbohydrate response element*, ChRE) próximo al promotor de HIF-1 α . De esta forma, la hiperglucemia puede estimular la transcripción y estabilidad de HIF-1 α en condiciones normóxicas aumentando la expresión de factores de crecimiento y enzimas glucolíticas. Sin embargo, en el trabajo de Bento y Pereira (2011) se describe que la hiperglucemia favorece la desestabilización y degradación de HIF-1 α , reduciendo así la respuesta celular a hipoxia. En el trabajo de Williamson *et al.*, 1993 se desarrolla por primera vez la teoría de la pseudohypoxia o hipoxia metabólica generada por la hiperglucemia, en la que existe un aumento de potencial reductor a nivel citoplasmático, un aumento de lactato sobre piruvato y una menor tasa respiratoria, aunque esta hipótesis ha sido rebatida por otros

autores. Por otro lado, está cobrando importancia la hipótesis metabólica del cáncer en la hipertensión pulmonar (Dromparis *et al.*, 2010), según la cual la excesiva proliferación celular y el aumento del consumo de O₂, puede generar un ambiente relativamente hipóxico que da lugar al desarrollo de un fenotipo glucolítico con una mayor captación de glucosa. Asimismo, los pulmones de pacientes con HP presentan mayor captación de glucosa (Xu W. *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que en el modelo de HP inducido por monocrotalina existe una mayor captación de glucosa pulmonar, con un aumento en la proliferación de CMLV de AP y activación normóxica de HIF-1 α que dirige el cambio metabólico hacia un fenotipo glucolítico (Marsboom *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que el desplazamiento del metabolismo glucolítico hacia la oxidación de la glucosa reduce la vasoconstricción y el remodelado de AP en ratones con HP (Sutendra *et al.*, 2010).

Tanto la hiperglucemia como la hipoxia son factores importantes de las complicaciones diabéticas que producen efectos deletéreos, dando lugar a complicaciones como la retinopatías neuropatías, nefropatías y enfermedades vasculares sistémicas y pulmonares. Es posible que tanto la hipoxia como la hiperglucemia activen un mecanismo común en el desarrollo de las alteraciones que dan lugar a HP. Por ello, en investigaciones futuras sería interesante estudiar a fondo su posible relación, ahondando en el mecanismo preciso que podrían estar compartiendo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1. Las arterias pulmonares del modelo de ratas diabéticas tipo 1 presentan 1) disfunción endotelial debido a un aumento de la expresión de NADPH oxidasa con el consiguiente aumento de la producción de ROS, 2) una exagerada respuesta vasoconstrictora a la 5-HT por aumento de actividad y de la expresión de COX-2 y 3) cambios en la expresión proteica pulmonar característicos de la HP en humanos y modelos animales. Sin embargo, estas alteraciones son insuficientes para elevar la presión arterial pulmonar.
2. A diferencia de los resultados encontrados en el modelo de diabetes tipo 1 o en modelos de resistencia a la insulina en ratón, las ratas Zucker obesas no desarrollan ninguna de las alteraciones características de la HP. Por el contrario, muestran una menor respuesta de las arterias pulmonares a vasoconstrictores que se previene mediante la inhibición de la iNOS.
3. El patrón de cambios en los marcadores de HP es diferente en la hipoxia moderada y en la diabetes tipo 1. La hipoxia pero no la diabetes reduce las corrientes K_v , mientras que la diabetes pero no la hipoxia induce disfunción endotelial. Ambos factores, de forma independiente, dan lugar a la disminución BMPR2 y al remodelado vascular pulmonar. La diabetes, por su parte, induce infiltrados pulmonares de macrófagos que se potencian en combinación con la hipoxia moderada. Se requiere la combinación de ambos factores para producir la elevación de la presión arterial pulmonar.
4. En conjunto, los datos presentados en esta Tesis Doctoral proporcionan evidencias funcionales, histológicas y moleculares que refuerzan la relación de la diabetes con la enfermedad vascular pulmonar. Nuestro trabajo remarca el papel de la diabetes mellitus como un factor que predispone al desarrollo de HP, induciendo alteraciones pulmonares tempranas y acelerando el desarrollo de la HP en combinación con otros factores de riesgo.

CONCLUSIONS.

1. Pulmonary arteries of type 1 diabetic rats develop 1) endothelial dysfunction as a result of up-regulation of NADPH oxidase and increased ROS production, 2) an exaggerated response to 5-HT due to activation and augmented expression of COX-2, and 3) changes in lung protein expression characteristic of clinical and experimental PH. However, these alterations are insufficient to elevate pulmonary pressure.
2. In contrast to the results found in rat models of type 1 diabetes or other mice models of insulin resistance, the obese Zucker rats do not show any of the characteristic features of PH but rather a reduced PA vasoconstrictor response which is prevented by inhibition of iNOS.
3. The pattern of changes in markers of PH is different for moderate hypoxia and diabetes. Hypoxia but not diabetes strongly reduces K_v currents, and diabetes but not hypoxia induces pulmonary artery endothelial dysfunction. Both factors independently downregulate BMPR2 and induce pulmonary vascular remodelling. However, diabetes but not hypoxia induces pulmonary infiltration of macrophages which is markedly increased when both factors are combined. The combination of both factors is required to induce a moderate elevation in pulmonary arterial pressure.
4. Taken together, our data provide functional, molecular and histological evidences that further strengthen the link between diabetes and pulmonary vascular disease. This work highlights the role of diabetes mellitus as a predisposing factor leading to early pulmonary alterations that in association with other risk factors may accelerate the onset of PH.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, P.I.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction is/is not mediated by increased production of reactive oxygen species. *J Appl Physiol.* 2006; 101: 1000; author reply 1004-1005.
- Abbott, R.D., Brand, F.N. & Kannel, W.B.** Epidemiology of some peripheral arterial findings in diabetic men and women: experiences from the Framingham Study. *Am J Med.* 1990; 88: 376-381.
- Agouni, A., Lagrue-Lak-Hal, A.H., Mostefai, H.A., Tesse, A., Mulder, P., Rouet, P., Desmoulin, F., Heymes, C., Martinez, M.C. & Andriantsitohaina, R.** Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One.* 2009; 4: e5557.
- Alexander, S.P., Mathie, A. & Peters, J.A.** Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 Suppl 2: S1-209.
- Al-Shafei, A.I., Wise, R.G., Gresham, G.A., Bronns, G., Carpenter, T.A., Hall, L.D. & Huang, C.L.** Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *J Physiol.* 2002; 538: 541-553.
- Archer, S.L., Huang, J., Henry, T., Peterson, D. & Weir, E.K.** A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res.* 1993; 73: 1100-1112.
- Atkinson, C., Stewart, S., Imamura, T., Trembath, R.C. & Morrell, N.W.** Immunolocalisation of BMPR-II and TGF- β type I and II receptors in primary plexogenic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20: 149.
- Atkinson, C., Stewart, S., Upton, P.D., Machado, R., Thomson, J.R., Trembath, R.C. & Morrell, N.W.** Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation.* 2002; 105: 1672-1678.
- Barbato, J.E., Zuckerbraun, B.S., Overhaus, M., Raman, K.G. & Tzeng, E.** Nitric oxide modulates vascular inflammation and intimal hyperplasia in insulin resistance and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289: H228-236.
- Barnes, P.J. & Liu, S.F.** Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev.* 1995; 47: 87-131.
- Baumbach, G.L., Sigmund, C.D. & Faraci, F.M.** Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension.* 2003; 41: 50-55.
- Beckman, J.S. & Koppenol, W.H.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271: C1424-1437.
- Beckman, J.A., Creager, M.A. & Libby, P.** Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002; 287: 2570-2581.
- Bento, C.F. & Pereira, P.** Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular

- response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia*. 2011, 54: 1946-1956.
- Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T. & Miyazono, K.** BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol*. 2000; 221: 249-258.
- Bochnowicz, S., Osborn, R.R., Luttmann, M.A., Loudon, C., Hart, T., Hay, D.W. & Underwood, D.C.** Differences in time-related cardiopulmonary responses to hypoxia in three rat strains. *Clin Exp Hypertens*. 2000; 22: 471-492.
- Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J.V. & Rossetti, L.** Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*. 1994; 93: 2438-2446.
- Bonnet, S., Michelakis, E.D., Porter, C.J., Andrade-Navarro, M.A., Thebaud, B., Haromy, A., Harry, G., Moudgil, R., McMurtry, M.S., Weir, E.K. & Archer, S.L.** An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2006; 113: 2630-2641.
- Bonnet, S. & Archer, S.L.** Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. 2007; 115: 56-69.
- Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Targher, G., Alberiche, M., Bonadonna, R.C. & Muggeo, M.** Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes*. 1998; 47: 1643-1649.
- Boveris, A.** Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 429-435.
- Bowers, R., Cool, C., Murphy, R.C., Tudor, R.M., Hopken, M.W., Flores, S.C. & Voelkel, N.F.** Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169: 764-769.
- Brand, M.D.** The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010, 45: 466-472.
- Brennan, L.A., Steinhorn, R.H., Wedgwood, S., Mata-Greenwood, E., Roark, E.A., Russell, J.A. & Black, S.M.** Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res*. 2003; 92: 683-691.
- Briones, A.M. & Touyz, R.M.** Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep*. 12: 135-142.
- Brown, L., Miller, J., Dagger, A. & Sernia, C.** Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998; 31: 108-115.
- Brownlee, M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813-820.

- Brownlee, M.** The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-1625.
- Burg, E.D., Platoshyn, O., Tsigelny, I.F., Lozano-Ruiz, B., Rana, B.K. & Yuan, J.X.** Tetramerization domain mutations in KCNA5 affect channel kinetics and cause abnormal trafficking patterns. *Am J Physiol Cell Physiol*. 298: C496-509.
- Burton, V.J., Ciuculan, L.I., Holmes, A.M., Rodman, D.M., Walker, C. & Budd, D.C.** Bone morphogenetic protein receptor II regulates pulmonary artery endothelial cell barrier function. *Blood*. 2011; 117: 333-341.
- Callebert, J., Esteve, J.M., Herve, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Drouet, L., Launay, J.M. & Maroteaux, L.** Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 724-731.
- Castier, Y., Brandes, R.P., Leseche, G., Tedgui, A. & Lehoux, S.** p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res*. 2005; 97: 533-540.
- Cathcart, M.C., Tamosiuniene, R., Chen, G., Neilan, T.G., Bradford, A., O'Byrne, K.J., Fitzgerald, D.J. & Pidgeon, G.P.** Cyclooxygenase-2-linked attenuation of hypoxia-induced pulmonary hypertension and intravascular thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326: 51-58.
- Chan, S.Y. & Loscalzo, J.** Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44: 14-30.
- Chang, S., Hypolite, J.A., Velez, M., Changolkar, A., Wein, A.J., Chacko, S. & DiSanto, M.E.** Downregulation of cGMP-dependent protein kinase-1 activity in the corpus cavernosum smooth muscle of diabetic rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287: R950-960.
- Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A. & FitzGerald, G.A.** Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science*. 2002; 296: 539-541.
- Cheng, X., Cheng, X.S., Kuo, K.H. & Pang, C.C.** Inhibition of iNOS augments cardiovascular action of noradrenaline in streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc Res*. 2004; 64: 298-307.
- Cherian, B., Meka, N., Katragadda, S. & Arora, R.** Therapeutic implications of diabetes in cardiovascular disease. *Am J Ther*. 2009; 16: e51-59.
- Chida, M. & Voelkel, N.F.** Effects of acute and chronic hypoxia on rat lung cyclooxygenase. *Am J Physiol*. 1996; 270: L872-878.
- Christman, B.W., McPherson, C.D., Newman, J.H., King, G.A., Bernard, G.R., Groves, B.M. & Loyd, J.E.** An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992; 327: 70-75.
- Coggins, M.P. & Bloch, K.D.** Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb*

- Vasc Biol.* 2007; 27: 1877-1885.
- Cogolludo, A. & Perez-Vizcaino, F.** 5-HT receptors and K(V) channel internalization. *Adv Exp Med Biol.* 2010 661: 391-401.
- Cogolludo, A., Moreno, L., Bosca, L., Tamargo, J. & Perez-Vizcaino, F.** Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C ζ . *Circ Res.* 2003; 93: 656-663.
- Cogolludo, A., Moreno, L., Lodi, F., Frazziano, G., Cobeno, L., Tamargo, J. & Perez-Vizcaino, F.** Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res.* 2006a; 98: 931-938.
- Cogolludo, A., Frazziano, G., Cobeno, L., Moreno, L., Lodi, F., Villamor, E., Tamargo, J. & Perez-Vizcaino, F.** Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann N Y Acad Sci.* 2006b; 1091: 41-51.
- Cogolludo, A., Moreno, L. & Villamor, E.** Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary arterial hypertension: implications for vasodilator therapy. *Pharmacology.* 2007; 79: 65-75.
- Cogolludo, A., Moreno, L., Frazziano, G., Moral-Sanz, J., Menendez, C., Castaneda, J., Gonzalez, C., Villamor, E. & Perez-Vizcaino, F.** Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 2009; 82: 296-302.
- Cohen, R.A. & Tong, X.** Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010, 55: 308-316.
- Cooke, C.L. & Davidge, S.T.** Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003; 60: 635-642.
- Cool, C.D., Stewart, J.S., Werahera, P., Miller, G.J., Williams, R.L., Voelkel, N.F. & Tudor, R.M.** Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol.* 1999; 155: 411-419.
- Coppock, E.A., Martens, J.R. & Tamkun, M.M.** Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281: L1-12.
- Cox, R.H. & Kikta, D.C.** Age-related changes in thoracic aorta of obese Zucker rats. *Am J Physiol.* 1992; 262: H1548-1556.
- Creager, M.A., Luscher, T.F., Cosentino, F. & Beckman, J.A.** Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation.* 2003; 108: 1527-1532.

- D'Alonzo, G.E., Barst, R.J., Ayres, S.M., Bergofsky, E.H., Brundage, B.H., Detre, K.M., Fishman, A.P., Goldring, R.M., Groves, B.M., Kernis, J.T. & et al.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med.* 1991; 115: 343-349.
- Darley-USmar, V., Wiseman, H. & Halliwell, B.** Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 1995; 369: 131-135.
- Davie, N., Haleen, S.J., Upton, P.D., Polak, J.M., Yacoub, M.H., Morrell, N.W. & Wharton, J.** ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 398-405.
- Dempsie, Y., Morecroft, I., Welsh, D.J., MacRitchie, N.A., Herold, N., Loughlin, L., Nilsen, M., Peacock, A.J., Harmar, A., Bader, M. & MacLean, M.R.** Converging evidence in support of the serotonin hypothesis of dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension with novel transgenic mice. *Circulation.* 2008; 117: 2928-2937.
- Deng, Z., Morse, J.H., Slager, S.L., Cuervo, N., Moore, K.J., Venetos, G., Kalachikov, S., Cayanis, E., Fischer, S.G., Barst, R.J., Hodge, S.E. & Knowles, J.A.** Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 737-744.
- Desireddi, J.R., Farrow, K.N., Marks, J.D., Waypa, G.B. & Schumacker, P.T.** Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca(2+) in pulmonary artery smooth muscle cells of mouse lungs slices. *Antioxid Redox Signal.* 2009, 12: 595-602.
- Deuchar, G.A., Docherty, A., MacLean, M.R. & Hicks, M.N.** Pulmonary hypertension secondary to left ventricular dysfunction: the role of nitric oxide and endothelin-1 in the control of pulmonary vascular tone. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 1060-1068.
- Didion, S.P., Ryan, M.J., Didion, L.A., Fegan, P.E., Sigmund, C.D. & Faraci, F.M.** Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002; 91: 938-944.
- Dikalov, S.** Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2011, 51: 1289-1301.
- Ding, H., Hashem, M. & Triggle, C.** Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *Eur J Pharmacol.* 2007; 561: 121-128.
- Dokken, B.B., Saengsirisuwan, V., Kim, J.S., Teachey, M.K. & Henriksen, E.J.** Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294: E615-621.
- Dorfmüller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M.** Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2003; 22: 358-363.
- Dromparis, P., Sutendra, G. & Michelakis, E.D.** The role of mitochondria in pulmonary

- vascular remodeling. *J Mol Med (Berl)*. 2010; 88: 1003-1010.
- Du, X.L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C. & Brownlee, M.** Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1341-1348.
- Du, Y., Miller, C.M. & Kern, T.S.** Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35: 1491-1499.
- Du, L., Sullivan, C.C., Chu, D., Cho, A.J., Kido, M., Wolf, P.L., Yuan, J.X., Deutsch, R., Jamieson, S.W. & Thistlethwaite, P.A.** Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 2003; 348: 500-509.
- Du, X., Edelstein, D., Obici, S., Higham, N., Zou, M.H. & Brownlee, M.** Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1071-1080.
- Eddahibi, S., Hanoun, N., Lanfumey, L., Lesch, K.P., Raffestin, B., Hamon, M. & Adnot, S.** Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1555-1562.
- Eddahibi, S., Humbert, M., Fadel, E., Raffestin, B., Darmon, M., Capron, F., Simonneau, G., Dartevelle, P., Hamon, M. & Adnot, S.** Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1141-1150.
- Eddahibi, S., Adnot, S., Frisdal, E., Levame, M., Hamon, M. & Raffestin, B.** Dexfenfluramine-associated changes in 5-hydroxytryptamine transporter expression and development of hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 297: 148-154.
- Eddahibi, S., Chaouat, A., Morrell, N., Fadel, E., Fuhrman, C., Bugnet, A.S., Dartevelle, P., Housset, B., Hamon, M., Weitzenblum, E. & Adnot, S.** Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation*. 2003; 108: 1839-1844.
- Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A.M., Dewachter, L., Fadel, E., Dartevelle, P., Humbert, M., Simonneau, G., Hanoun, N., Saurini, F., Hamon, M. & Adnot, S.** Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*. 2006; 113: 1857-1864.
- Ellmark, S.H., Dusting, G.J., Fui, M.N., Guzzo-Pernell, N. & Drummond, G.R.** The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 2005; 65: 495-504.
- El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P.L., Roeder, R.G., Cooper, M.E. & Brownlee, M.** Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered

- gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med.* 2008; 205: 2409-2417.
- Esteve, J.M., Launay, J.M., Kellermann, O. & Maroteaux, L.** Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem Biophys.* 2007; 47: 33-44.
- Fagan, K.A., Fouty, B.W., Tyler, R.C., Morris, K.G., Jr., Hepler, L.K., Sato, K., LeCras, T.D., Abman, S.H., Weinberger, H.D., Huang, P.L., McMurtry, I.F. & Rodman, D.M.** The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest.* 1999; 103: 291-299.
- Faller, D.V.** Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26: 74-84.
- Faraci, F.M. & Didion, S.P.** Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1367-1373.
- Fessel, J.P., Loyd, J.E. & Austin, E.D.** The genetics of pulmonary arterial hypertension in the post-BMP2 era. *Pulm Circ.* 1: 305-319.
- Fineman, J.R., Soifer, S.J. & Heymann, M.A.** Regulation of pulmonary vascular tone in the perinatal period. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 115-134.
- Firth, A.L., Remillard, C.V., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E.A. & Yuan, J.X.** Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulm Circ.* 2011, 1: 48-71.
- Frank, D.B., Lowery, J., Anderson, L., Brink, M., Reese, J. & de Caestecker, M.** Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in Bmpr2 mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 294: L98-109.
- Frasch, H.F., Marshall, C. & Marshall, B.E.** Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1999; 276: L304-310.
- Frazziano, G., Moreno, L., Moral-Sanz, J., Menendez, C., Escolano, L., Gonzalez, C., Villamor, E., Alvarez-Sala, J.L., Cogolludo, A.L. & Perez-Vizcaino, F.** Neutral sphingomyelinase, NADPH oxidase and reactive oxygen species. Role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cell Physiol.* 2011, 226: 2633-2640.
- Fredenburgh, L.E., Liang, O.D., Macias, A.A., Polte, T.R., Liu, X., Riascos, D.F., Chung, S.W., Schissel, S.L., Ingber, D.E., Mitsialis, S.A., Kourembanas, S. & Perrella, M.A.** Absence of cyclooxygenase-2 exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances contractility of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2008; 117: 2114-2122.
- Fredersdorf, S., Thumann, C., Ulucan, C., Griesse, D.P., Luchner, A., Riegger, G.A., Kromer, E.P. & Weil, J.** Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol.* 2004; 13: 11-19.
- Frid, M.G., Brunetti, J.A., Burke, D.L., Carpenter, T.C., Davie, N.J., Reeves, J.T.,**

- Roedersheimer, M.T., van Rooijen, N. & Stenmark, K.R.** Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol.* 2006; 168: 659-669.
- Frisbee, J.C.** Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289: R307-R316.
- Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J.A., Ueki, K. & Kaneki, M.** A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes.* 2005; 54: 1340-1348.
- Galie, N., Manes, A. & Branzi, A.** Evaluation of pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Cardiol.* 2004; 19: 575-581.
- Gangopahyay, A., Oran, M., Bauer, E.M., Wertz, J.W., Comhair, S.A., Erzurum, S.C. & Bauer, P.M.** Bone morphogenetic protein receptor II is a novel mediator of endothelial nitric-oxide synthase activation. *J Biol Chem.* 2011, 286: 33134-33140.
- Garcia-Redondo, A.B., Briones, A.M., Beltran, A.E., Alonso, M.J., Simonsen, U. & Salaices, M.** Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328: 19-27.
- Gardiner, S.M. & Bennett, T.** Involvement of nitric oxide in the regional haemodynamic effects of perindoprilat and captopril in hypovolaemic Brattleboro rats. *Br J Pharmacol.* 1992; 107: 1181-1191.
- Giacco, F. & Brownlee, M.** Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010, 107: 1058-1070.
- Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R.P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W.P. & Stewart, D.J.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1732-1739.
- Ginsberg, H.N. & Huang, L.S.** The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk.* 2000; 7: 325-331.
- Gonzalez, T., David, M., Moreno, C., Macias, A. & Valenzuela, C.** Kv1.5-Kv beta interactions: molecular determinants and pharmacological consequences. *Mini Rev Med Chem.* 2010, 10: 635-642.
- Griendling, K.K., Sorescu, D. & Ushio-Fukai, M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000; 86: 494-501.
- Guignabert, C., Raffestin, B., Benferhat, R., Raoul, W., Zadigue, P., Rideau, D., Hamon, M., Adnot, S. & Eddahibi, S.** Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation.* 2005; 111: 2812-2819.

- Guignabert, C., Izikki, M., Tu, L.I., Li, Z., Zadigue, P., Barlier-Mur, A.M., Hanoun, N., Rodman, D., Hamon, M., Adnot, S. & Eddahibi, S.** Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2006; 98: 1323-1330.
- Gunnnett, C.A., Heistad, D.D. & Faraci, F.M.** Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke.* 2003; 34: 2970-2974.
- Guo, Z.M., Yang, H., Hamilton, M.L., VanRemmen, H. & Richardson, A.** Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorta. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122: 1771-1786.
- Gurney, A.M. & Joshi, S.** The role of twin pore domain and other K⁺ channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Novartis Found Symp.* 2006; 272: 218-228; discussion 228-233, 274-219.
- Gurney, A.M. & Howarth, F.C.** Effects of streptozotocin-induced diabetes on the pharmacology of rat conduit and resistance intrapulmonary arteries. *Cardiovasc Diabetol.* 2009; 8: 4.
- Gurney, A. & Manoury, B.** Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J.* 2009; 38: 305-318.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W. & Wang, X.** International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 473-508.
- Guvener, N., Tutuncu, N.B., Akcay, S., Eyuboglu, F. & Gokcel, A.** Alveolar gas exchange in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J.* 2003; 50: 663-667.
- Guzik, T.J., Mussa, S., Gastaldi, D., Sadowski, J., Ratnatunga, C., Pillai, R. & Channon, K.M.** Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002; 105: 1656-1662.
- Hahn, A.W., Resink, T.J., Bernhardt, J., Ferracin, F. & Buhler, F.R.** Stimulation of autocrine platelet--derived growth factor AA-homodimer and transforming growth factor beta in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 178: 1451-1458.
- Han, D., Canali, R., Rettori, D. & Kaplowitz, N.** Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 1136-1144.
- Hansmann, G., Wagner, R.A., Schellong, S., Perez, V.A., Urashima, T., Wang, L., Sheikh, A.Y., Suen, R.S., Stewart, D.J. & Rabinovitch, M.** Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-

- gamma activation. *Circulation*. 2007; 115: 1275-1284.
- Harker, C.T., O'Donnell, M.P., Kasiske, B.L., Keane, W.F. & Katz, S.A.** The renin-angiotensin system in the type II diabetic obese Zucker rat. *J Am Soc Nephrol*. 1993; 4: 1354-1361.
- Harrison.** Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th edición, 2009. Editorial McGraw-hill Interamericana. Capítulo 338.
- Haworth, S.G.** Development of the normal and hypertensive pulmonary vasculature. *Exp Physiol*. 1995; 80: 843-853.
- Hayabuchi, Y., Standen, N.B. & Davies, N.W.** Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K(+) channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281: H2480-2489.
- Heinemann, S.H., Rettig, J., Graack, H.R. & Pongs, O.** Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J Physiol*. 1996; 493 (Pt 3): 625-633.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. & ten Dijke, P.** TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997; 390: 465-471.
- Hernandez-Diaz, S., Van Marter, L.J., Werler, M.M., Louik, C. & Mitchell, A.A.** Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics*. 2007; 120: e272-282.
- Herve, P., Launay, J.M., Scrobohaci, M.L., Brenot, F., Simonneau, G., Petitpretz, P., Poubeau, P., Cerrina, J., Duroux, P. & Drouet, L.** Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1995; 99: 249-254.
- Herve, P., Humbert, M., Sitbon, O., Parent, F., Nunes, H., Legal, C., Garcia, G. & Simonneau, G.** Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin Chest Med*. 2001; 22: 451-458.
- Hironaka, E., Hongo, M., Sakai, A., Mawatari, E., Terasawa, F., Okumura, N., Yamazaki, A., Ushiyama, Y., Yazaki, Y. & Kinoshita, O.** Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc Res*. 2003; 60: 692-699.
- Hobbs, A.J. & Ignarro, L.J.** Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol*. 1996; 269: 134-148.
- Hobbs, A.J.** Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*. 1997; 18: 484-491.
- Hong, Z., Weir, E.K., Nelson, D.P. & Olschewski, A.** Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31: 337-343.
- Huijberts, M.S., Wolffenbuttel, B.H., Boudier, H.A., Crijns, F.R., Kruseman, A.C., Poitevin, P. & Levy, B.I.** Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest*. 1993; 92: 1407-1411.

- Humbert, M., Morrell, N.W., Archer, S.L., Stenmark, K.R., MacLean, M.R., Lang, I.M., Christman, B.W., Weir, E.K., Eickelberg, O., Voelkel, N.F. & Rabinovitch, M.** Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 13S-24S.
- Hwang, J., Ing, M.H., Salazar, A., Lassegue, B., Griendling, K., Navab, M., Sevanian, A. & Hsiai, T.K.** Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res.* 2003; 93: 1225-1232.
- Ihnat, M.A., Thorpe, J.E., Kamat, C.D., Szabo, C., Green, D.E., Warnke, L.A., Lacza, Z., Cselenyak, A., Ross, K., Shakir, S., Piconi, L., Kaltreider, R.C. & Ceriello, A.** Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia.* 2007; 50: 1523-1531.
- Ihnat, M.A., Thorpe, J.E. & Ceriello, A.** Hypothesis: the 'metabolic memory', the new challenge of diabetes. *Diabet Med.* 2007; 24: 582-586.
- Incalzi, R.A., Corsonello, A., Pedone, C., Corica, F., Carosella, L., Mazzei, B., Perticone, F. & Carbonin, P.** Identifying older diabetic patients at risk of poor glycemic control. *BMC Geriatr.* 2002; 2: 4.
- Inoue, N., Ramasamy, S., Fukai, T., Nerem, R.M. & Harrison, D.G.** Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1996; 79: 32-37.
- Isoe, T., Makino, Y., Mizumoto, K., Sakagami, H., Fujita, Y., Honjo, J., Takiyama, Y., Itoh, H. & Haneda, M.** High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int.* 2010, 78: 48-59.
- Jankov, R.P., Belcastro, R., Ovcina, E., Lee, J., Massaeli, H., Lye, S.J. & Tanswell, A.K.** Thromboxane A(2) receptors mediate pulmonary hypertension in 60% oxygen-exposed newborn rats by a cyclooxygenase-independent mechanism. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 208-214.
- Jarajapu, Y.P., Guberski, D.L., Grant, M.B. & Knot, H.J.** Myogenic tone and reactivity of cerebral arteries in type II diabetic BBZDR/Wor rat. *Eur J Pharmacol.* 2008; 579: 298-307.
- Jay, D., Hitomi, H. & Griendling, K.K.** Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 183-192.
- Jayet, P.Y., Rimoldi, S.F., Stuber, T., Salmon, C.S., Hutter, D., Rexhaj, E., Thalmann, S., Schwab, M., Turini, P., Sartori-Cucchia, C., Nicod, P., Villena, M., Allemann, Y., Scherrer, U. & Sartori, C.** Pulmonary and systemic vascular dysfunction in young offspring of mothers with preeclampsia. *Circulation.* 2010, 122: 488-494.
- Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L., Chatterjee, A., Feener, E.P., Myers, M.G., Jr., White, M.F. & King,**

- G.L.** Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999; 48: 1120-1130.
- Jones, P.L., Cowan, K.N. & Rabinovitch, M.** Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*. 1997; 150: 1349-1360.
- Jude, E.B., Oyibo, S.O., Chalmers, N. & Boulton, A.J.** Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*. 2001; 24: 1433-1437.
- Julian, R.J.** Physiological, management and environmental triggers of the ascites syndrome: a review. *Avian Pathol*. 2000; 29: 519-527.
- Kabitz, H.J., Sonntag, F., Walker, D., Schwoerer, A., Walterspacher, S., Kaufmann, S., Beuschlein, F., Seufert, J. & Windisch, W.** Diabetic polyneuropathy is associated with respiratory muscle impairment in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 191-197.
- Kam, K.L., Hendriks, M.G., Pijl, A.J., van Marle, J., van Veen, H.A., Pfaffendorf, M. & van Zwieten, P.A.** Contractile responses to various stimuli in isolated resistance vessels from simultaneously hypertensive and streptozotocin-diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996; 27: 167-175.
- Kamata, K., Miyata, N., Abiru, T. & Kasuya, Y.** Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sci*. 1992; 50: 1379-1387.
- Katugampola, S.D. & Davenport, A.P.** Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT(1) receptor antagonist losartan. *Br J Pharmacol*. 2001; 134: 1385-1392.
- Kawabata, M., Imamura, T. & Miyazono, K.** Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998; 9: 49-61.
- Keaney, J.F., Jr. & Loscalzo, J.** Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. *Circulation*. 1999; 99: 189-191.
- Kedzierski, R.M. & Yanagisawa, M.** Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 851-876.
- Keegan, A., Morecroft, I., Smillie, D., Hicks, M.N. & MacLean, M.R.** Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circ Res*. 2001; 89: 1231-1239.
- Kim, G.H., Ryan, J.J., Marsboom, G. & Archer, S.L.** Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 2011, 1: 347-356.
- Klein, R., Klein, B.E. & Moss, S.E.** Relation of glycemic control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1996; 124: 90-96.

- Klein, M., Schermuly, R.T., Ellinghaus, P., Milting, H., Riedl, B., Nikolova, S., Pullamsetti, S.S., Weissmann, N., Dony, E., Savai, R., Ghofrani, H.A., Grimminger, F., Busch, A.E. & Schafer, S.** Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation*. 2008; 118: 2081-2090.
- Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J.K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T. & Narumiya, S.** Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004; 114: 784-794.
- Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F.** PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res*. 1984, 59: 612-619
- Lam, C.F., Peterson, T.E., Croatt, A.J., Nath, K.A. & Katusic, Z.S.** Functional adaptation and remodeling of pulmonary artery in flow-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H2334-2341.
- Lam, C.S., Borlaug, B.A., Kane, G.C., Enders, F.T., Rodeheffer, R.J. & Redfield, M.M.** Age-associated increases in pulmonary artery systolic pressure in the general population. *Circulation*. 2009; 119: 2663-2670.
- Lambeth, J.D.** Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43: 332-347.
- Lane, K.L., Talati, M., Austin, E., Hemnes, A.R., Johnson, J.A., Fessel, J.P., Blackwell, T., Mernaugh, R.L., Robinson, L., Fike, C., Roberts, L.J., 2nd & West, J.** Oxidative injury is a common consequence of BMPR2 mutations. *Pulm Circ*. 2011, 1: 72-83.
- Lane, K.B., Machado, R.D., Pauciulo, M.W., Thomson, J.R., Phillips, J.A., 3rd, Loyd, J.E., Nichols, W.C. & Trembath, R.C.** Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*. 2000; 26: 81-84.
- Lassegue, B. & Griendling, K.K.** NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010, 30: 653-661.
- Laude, K., Cai, H., Fink, B., Hoch, N., Weber, D.S., McCann, L., Kojda, G., Fukai, T., Schmidt, H.H., Dikalov, S., Ramasamy, S., Gamez, G., Griendling, K.K. & Harrison, D.G.** Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H7-12.
- Launay, J.M., Herve, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebort, J., Nebigil, C.G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G. & Maroteaux, L.** Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*. 2002; 8: 1129-1135.

- Lawrence, R.N., Clelland, C., Beggs, D., Salama, F.D., Dunn, W.R. & Wilson, V.G.** Differential role of vasoactive prostanoids in porcine and human isolated pulmonary arteries in response to endothelium-dependent relaxants. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 1128-1137.
- Le Cras, T.D., Xue, C., Rengasamy, A., Johns, R.A.** Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270: L164-170.
- Le Cras, T.D., Kim, D.H., Markham, N.E. & Abman, A.S.** Early abnormalities of pulmonary vascular development in the Fawn-Hooded rat raised at Denver's altitude. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L283-291.
- Le Cras, T.D. & McMurtry, I.F.** Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280: L575-582.
- Lee, S.L., Wang, W.W. & Fanburg, B.L.** Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24: 855-858.
- Lesniewski, L.A., Donato, A.J., Behnke, B.J., Woodman, C.R., Laughlin, M.H., Ray, C.A. & Delp, M.D.** Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294: H1840-1850.
- Li, H., Chen, S.J., Chen, Y.F., Meng, Q.C., Durand, J., Oparil, S. & Elton, T.S.** Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* 1994; 77: 1451-1459.
- Li, M., Riddle, S.R., Frid, M.G., El Kasmi, K.C., McKinsey, T.A., Sokol, R.J., Strassheim, D., Meyrick, B., Yeager, M.E., Flockton, A.R., McKeon, B.A., Lemon, D.D., Horn, T.R., Anwar, A., Barajas, C. & Stenmark, K.R.** Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol.* 2011; 187: 2711-2722.
- Liu, F., Orr, J.A. & Wu, J.Y.** Prostaglandin B2-induced pulmonary hypertension is mediated by TxA2/PGH2 receptor stimulation. *Am J Physiol.* 1994; 267: L602-608.
- Liu, Y., Suzuki, Y.J., Day, R.M. & Fanburg, B.L.** Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res.* 2004; 95: 579-586.
- Liu, Y. & Fanburg, B.L.** Phospholipase D signaling in serotonin-induced mitogenesis of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: L471-478.
- Long, L., MacLean, M.R., Jeffery, T.K., Morecroft, I., Yang, X., Rudarakanchana, N., Southwood, M., James, V., Trembath, R.C. & Morrell, N.W.** Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res.* 2006; 98:

818-827.

- Lourenco, A.P., Vasques-Novoa, F., Fontoura, D., Bras-Silva, C., Roncon-Albuquerque, R., Jr. & Leite-Moreira, A.F.** A Western-type diet attenuates pulmonary hypertension with heart failure and cardiac cachexia in rats. *J Nutr.* 2012, 141: 1954-1960.
- Lourenco, A.P., Fontoura, D., Henriques-Coelho, T. & Leite-Moreira, A.F.** Current pathophysiological concepts and management of pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* 155: 350-361.
- Lu, X., Guo, X., Karathanasis, S.K., Zimmerman, K.M., Onyia, J.E., Peterson, R.G. & Kassab, G.S.** Rosiglitazone reverses endothelial dysfunction but not remodeling of femoral artery in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2010, 9: 19.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Stern, Y., Shea, S. & Mayeux, R.** Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am J Epidemiol.* 2001; 154: 635-641.
- Luscher, T.F.** Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J.* 1992; 13 Suppl D: 50-55.
- Luscher, T.F., Creager, M.A., Beckman, J.A. & Cosentino, F.** Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation.* 2003; 108: 1655-1661.
- Machado, R.D. et al.** BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 92-102.
- Machado, R.D., Eickelberg, O., Elliott, C.G., Geraci, M.W., Hanaoka, M., Loyd, J.E., Newman, J.H., Phillips, J.A., 3rd, Soubrier, F., Trembath, R.C. & Chung, W.K.** Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: S32-42.
- Mackie, A.R. & Byron, K.L.** Cardiovascular KCNQ (Kv7) potassium channels: physiological regulators and new targets for therapeutic intervention. *Mol Pharmacol.* 2008; 74: 1171-1179.
- Maclean, M.R. & Dempsie, Y.** The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited. *Adv Exp Med Biol.* 2010, 661: 309-322.
- MacLean, M.R., Sweeney, G., Baird, M., McCulloch, K.M., Houslay, M. & Morecroft, I.** 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1996; 119: 917-930.
- MacLean, M.R., Clayton, R.A., Templeton, A.G. & Morecroft, I.** Evidence for 5-HT₁-like receptor-mediated vasoconstriction in human pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1996; 119: 277-282.
- MacLean, M.R., Herve, P., Eddahibi, S. & Adnot, S.** 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension.

- Br J Pharmacol.* 2000; 131: 161-168.
- MacLean, M.R. & Dempsie, Y.** Serotonin and pulmonary hypertension--from bench to bedside? *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9: 281-286.
- Macmillan-Crow, L.A. & Cruthirds, D.L.** Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res.* 2001; 34: 325-336.
- Makarevich, A.E., Valevich, V.E. & Pochtavtsev, A.U.** Evaluation of pulmonary hypertension in COPD patients with diabetes. *Adv Med Sci.* 2007; 52: 265-272.
- Mam, V., Tanbe, A.F., Vitali, S.H., Arons, E., Christou, H.A. & Khalil, R.A.** Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 332: 455-462.
- Mandegar, M., Fung, Y.C., Huang, W., Remillard, C.V., Rubin, L.J. & Yuan, J.X.** Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res.* 2004; 68: 75-103.
- Marsboom, G., Wietholt, C., Haney, C.R., Toth, P.T., Ryan, J.J., Morrow, E., Thenappan, T., Bache-Wiig, P., Piao, L., Paul, J., Chen, C.T. & Archer, S.L.** Lung 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Diagnosis and Monitoring of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012, 185: 670-679.
- Massague, J. & Chen, Y.G.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000; 14: 627-644.
- Matata, B.M. & Galinanes, M.** Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *J Biol Chem.* 2002; 277: 2330-2335.
- Mayhan, W.G., Arrick, D.M., Patel, K.P. & Sun, H.** Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011, 300: H1013-1020.
- McMurtry, M.S., Bonnet, S., Wu, X., Dyck, J.R., Haromy, A., Hashimoto, K. & Michelakis, E.D.** Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res.* 2004; 95: 830-840.
- McNamara, I.M., Borella, A.W., Bialowas, L.A. & Whitaker-Azmitia, P.M.** Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: social, behavioral and peptide changes. *Brain Res.* 2008; 1189: 203-214.
- Mehta, S., Stewart, D.J., Langleben, D. & Levy, R.D.** Short-term pulmonary vasodilation with L-arginine in pulmonary hypertension. *Circulation.* 1995; 92: 1539-1545.
- Meigs, J.B., Larson, M.G., Fox, C.S., Keaney, J.F., Jr., Vasan, R.S. & Benjamin, E.J.** Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care.* 2007; 30: 2529-2535.
- Meyrick, B., Hislop, A. & Reid, L.** Pulmonary arteries of the normal rat: the thick walled

- oblique muscle segment. *J Anat.* 1978; 125: 209-221.
- Miao, F., Gonzalo, I.G., Lanting, L. & Natarajan, R.** In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J Biol Chem.* 2004; 279: 18091-18097.
- Michelakis, E.D., Hampl, V., Nsair, A., Wu, X., Harry, G., Haromy, A., Gurtu, R. & Archer, S.L.** Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res.* 2002a; 90: 1307-1315.
- Michelakis, E.D., McMurtry, M.S., Wu, X.C., Dyck, J.R., Moudgil, R., Hopkins, T.A., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Waite, R. & Archer, S.L.** Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation.* 2002b; 105: 244-250.
- Mitani, Y., Maruyama, K. & Sakurai, M.** Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation.* 1997; 96: 689-697.
- Mitchell, J.A. & Warner, T.D.** Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol.* 1999; 128: 1121-1132.
- Mittal, M., Roth, M., Konig, P., Hofmann, S., Dony, E., Goyal, P., Selbitz, A.C., Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Kwapiszewska, G., Kummer, W., Klepetko, W., Hoda, M.A., Fink, L., Hanze, J., Seeger, W., Grimminger, F., Schmidt, H.H. & Weissmann, N.** Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res.* 2007; 101: 258-267.
- Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M.** Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 2010, 147: 35-51.
- Mokdad, A.H., Bowman, B.A., Ford, E.S., Vinicor, F., Marks, J.S. & Koplan, J.P.** The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA.* 2001a; 286: 1195-1200.
- Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Nelson, D.E., Engelgau, M.M., Vinicor, F. & Marks, J.S.** The continuing increase of diabetes in the US. *Diabetes Care.* 2001b; 24: 412.
- Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S. & Salvemini, D.** Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 217-252.
- Monaco, J.A. & Burke-Wolin, T.** NO and H₂O₂ mechanisms of guanylate cyclase activation in oxygen-dependent responses of rat pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 1995; 268: L546-550.
- Morecroft, I., Heeley, R.P., Prentice, H.M., Kirk, A. & MacLean, M.R.** 5-hydroxytryptamine

- receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br J Pharmacol.* 1999; 128: 730-734.
- Morrell, N.W., Yang, X., Upton, P.D., Jourdan, K.B., Morgan, N., Sheares, K.K. & Trembath, R.C.** Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation.* 2001; 104: 790-795.
- Morrell, N.W.** Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3: 680-686.
- Morrell, N.W., Adnot, S., Archer, S.L., Dupuis, J., Jones, P.L., MacLean, M.R., McMurtry, I.F., Stenmark, K.R., Thistlethwaite, P.A., Weissmann, N., Yuan, J.X. & Weir, E.K.** Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: S20-31.
- Morty, R.E., Nejman, B., Kwapiszewska, G., Hecker, M., Zakrzewicz, A., Kouri, F.M., Peters, D.M., Dumitrascu, R., Seeger, W., Knaus, P., Schermuly, R.T. & Eickelberg, O.** Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1072-1078.
- Moudgil, R., Michelakis, E.D. & Archer, S.L.** The role of k⁺ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation.* 2006; 13: 615-632.
- Movahed, M.R., Hashemzadeh, M. & Jamal, M.M.** The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type II diabetes mellitus. *Chest.* 2005; 128: 3568-3571.
- Muhlestein, J.B., Anderson, J.L., Horne, B.D., Lavasani, F., Allen Maycock, C.A., Bair, T.L., Pearson, R.R. & Carlquist, J.F.** Effect of fasting glucose levels on mortality rate in patients with and without diabetes mellitus and coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Am Heart J.* 2003; 146: 351-358.
- Mulvany, M.J. & Aalkjaer, C.** Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990; 70: 921-961.
- Murray, T.R., Chen, L., Marshall, B.E. & Macarak, E.J.** Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 3: 457-465.
- Nacci, C., Tarquinio, M. & Montagnani, M.** Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes. *Intern Emerg Med.* 2009; 4: 107-116.
- Nagaoka, T., Muramatsu, M., Sato, K., McMurtry, I., Oka, M. & Fukuchi, Y.** Mild hypoxia causes severe pulmonary hypertension in fawn-hooded but not in Tester Moriyama rats. *Respir Physiol.* 2001; 127: 53-60.
- Nagareddy, P.R., Xia, Z., McNeill, J.H. & MacLeod, K.M.** Increased expression of iNOS is

- associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H2144-2152.
- Nagaya, N., Uematsu, M., Oya, H., Sato, N., Sakamaki, F., Kyotani, S., Ueno, K., Nakanishi, N., Yamagishi, M. & Miyatake, K.** Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 887-891.
- Nathan, D.M., Cleary, P.A., Backlund, J.Y., Genuth, S.M., Lachin, J.M., Orchard, T.J., Raskin, P. & Zinman, B.** Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005; 353: 2643-2653.
- Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Cassanye, A., Serrano, J., Gonzalo, H., Boada, J., Prat, J., Portero-Otin, M. & Pamplona, R.** Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp Diabetes Res*. 2012: 696215.
- Nelson, M.T. & Quayle, J.M.** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995; 268: C799-822.
- Nett, P.C., Ortmann, J., Celeiro, J., Haas, E., Hofmann-Lehmann, R., Tornillo, L., Terraciano, L.M. & Barton, M.** Transcriptional regulation of vascular bone morphogenetic protein by endothelin receptors in early autoimmune diabetes mellitus. *Life Sci*. 2006; 78: 2213-2218.
- Nielson, C. & Lange, T.** Blood glucose and heart failure in nondiabetic patients. *Diabetes Care*. 2005; 28: 607-611.
- Niranjan, V., McBrayer, D.G., Ramirez, L.C., Raskin, P. & Hsia, C.C.** Glycemic control and cardiopulmonary function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med*. 1997; 103: 504-513.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I. & Knaus, P.** The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002; 277: 5330-5338.
- Noronha, B.T., Li, J.M., Wheatcroft, S.B., Shah, A.M. & Kearney, M.T.** Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes*. 2005; 54: 1082-1089.
- Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K. & Maeda, H.** Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 342: 261-274.
- Okon, E.B., Chung, A.W., Rauniyar, P., Padilla, E., Tejerina, T., McManus, B.M., Luo, H. & van Breemen, C.** Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005; 54: 2415-2423.

- Olschewski, A.** Targeting TASK-1 channels as a therapeutic approach. *Adv Exp Med Biol.* 2010, 661: 459-473.
- Olschewski, A., Hong, Z., Nelson, D.P. & Weir, E.K.** Graded response of K⁺ current, membrane potential, and [Ca²⁺]_i to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283: L1143-1150.
- Olschewski, A., Hong, Z., Peterson, D.A., Nelson, D.P., Porter, V.A. & Weir, E.K.** Opposite effects of redox status on membrane potential, cytosolic calcium, and tone in pulmonary arteries and ductus arteriosus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286: L15-22.
- Orr, J.A., Shams, H., Karla, W., Peskar, B.A. & Scheid, P.** Transient ventilatory responses to endotoxin infusion in the cat are mediated by thromboxane A₂. *Respir Physiol.* 1993; 93: 189-201.
- Ouchi, Y., Han, S.Z., Kim, S., Akishita, M., Kozaki, K., Toba, K. & Orimo, H.** Augmented contractile function and abnormal Ca²⁺ handling in the aorta of Zucker obese rats with insulin resistance. *Diabetes.* 1996; 45 Suppl 3: S55-58.
- Papaharalambus, C.A. & Griendling, K.K.** Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2007; 17: 48-54.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C. & Kleinert, H.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 23: 75-93.
- Pérez-Vizcaino F, López-López JG, Santiago R, Cogolludo A, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, Alonso MJ, Salas M, Tamargo J.** Postnatal maturation in nitric oxide-induced pulmonary artery relaxation involving cyclooxygenase-1 activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, 283(4):L839-48
- Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A. & Moreno, L.** Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010, 174: 212-220.
- Perros, F., Dorfmüller, P., Souza, R., Durand-Gasselin, I., Godot, V., Capel, F., Adnot, S., Eddahibi, S., Mazmanian, M., Fadel, E., Herve, P., Simonneau, G., Emilie, D. & Humbert, M.** Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007; 29: 937-943.
- Pidgeon, G.P., Tamosiuniene, R., Chen, G., Leonard, I., Belton, O., Bradford, A. & Fitzgerald, D.J.** Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: regulation by cyclooxygenase-2. *Circulation.* 2004; 110: 2701-2707.
- Platoshyn, O., Brevnova, E.E., Burg, E.D., Yu, Y., Remillard, C.V. & Yuan, J.X.** Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290: C907-916.
- Pozeg, Z.I., Michelakis, E.D., McMurtry, M.S., Thebaud, B., Wu, X.C., Dyck, J.R., Hashimoto, K., Wang, S., Moudgil, R., Harry, G., Sultanian, R., Koshal, A. &**

- Archer, S.L.** In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation*. 2003; 107: 2037-2044.
- Price, L.C., Montani, D., Tcherakian, C., Dorfmüller, P., Souza, R., Gambaryan, N., Chaumais, M.C., Shao, D.M., Simonneau, G., Howard, L.S., Adcock, I.M., Wort, S.J., Humbert, M. & Perros, F.** Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur Respir J*. 2011, 37: 813-822.
- Qiao, Q., Pyorala, K., Pyorala, M., Nissinen, A., Lindstrom, J., Tilvis, R. & Tuomilehto, J.** Two-hour glucose is a better risk predictor for incident coronary heart disease and cardiovascular mortality than fasting glucose. *Eur Heart J*. 2002; 23: 1267-1275.
- Qiao, Q., Tuomilehto, J. & Borch-Johnsen, K.** Post-challenge hyperglycaemia is associated with premature death and macrovascular complications. *Diabetologia*. 2003; 46 Suppl 1: M17-21.
- Rabinovitch, M.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2008; 118: 2372-2379.
- Rakotoniaina, Z., Guerard, P., Lirussi, F., Rochette, L., Dumas, M., Goirand, F. & Bardou, M.** Celecoxib but not the combination of celecoxib+atorvastatin prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2008; 378: 241-251.
- Ramasamy, R., Yan, S.F. & Schmidt, A.M.** Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci*. 2011, 1243: 88-102.
- Rathore, R., Zheng, Y.M., Niu, C.F., Liu, Q.H., Korde, A., Ho, Y.S. & Wang, Y.X.** Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45: 1223-1231.
- Remillard, C.V. & Yuan, J.X.** Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286: L49-67.
- Remillard, C.V., Tigno, D.D., Platoshyn, O., Burg, E.D., Brevnova, E.E., Conger, D., Nicholson, A., Rana, B.K., Channick, R.N., Rubin, L.J., O'Connor D, T. & Yuan, J.X.** Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292: C1837-1853.
- Resta, T.C., Gonzales, R.J., Dail, W.G., Sanders, T.C. & Walker, B.R.** Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1997; 272: H806-813.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. & Pongs, O.**

- Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*. 1994; 369: 289-294.
- Rexhaj, E., Bloch, J., Jayet, P.Y., Rimoldi, S.F., Dessen, P., Mathieu, C., Tolsa, J.F., Nicod, P., Scherrer, U. & Sartori, C.** Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011, 301: H247-252.
- Rich, S., Dantzker, D.R., Ayres, S.M., Bergofsky, E.H., Brundage, B.H., Detre, K.M., Fishman, A.P., Goldring, R.M., Groves, B.M., Koerner, S.K. & et al.** Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med*. 1987; 107: 216-223.
- Rivera, L., Moron, R., Sanchez, M., Zarzuelo, A. & Galisteo, M.** Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16: 2081-2087.
- Robbins, I.M., Barst, R.J., Rubin, L.J., Gaine, S.P., Price, P.V., Morrow, J.D. & Christman, B.W.** Increased levels of prostaglandin D(2) suggest macrophage activation in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2001; 120: 1639-1644.
- Robertson, T.P., Dipp, M., Ward, J.P., Aaronson, P.I. & Evans, A.M.** Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br J Pharmacol*. 2000; 131: 5-9.
- Rodat, L., Savineau, J.P., Marthan, R. & Guibert, C.** Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Arch*. 2007; 454: 41-51.
- Rodriguez-Manas, L., Lopez-Doriga, P., Petidier, R., Neira, M., Solis, J., Pavon, I., Peiro, C. & Sanchez-Ferrer, C.F.** Effect of glycaemic control on the vascular nitric oxide system in patients with type 1 diabetes. *J Hypertens*. 2003; 21: 1137-1143.
- Rodriguez-Vita, J., Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Sanchez-Lopez, E., Plaza, J.J. & Egido, J.** Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005; 97: 125-134.
- Romanko, O.P. & Stepp, D.W.** Reduced constrictor reactivity balances impaired vasodilation in the mesenteric circulation of the obese Zucker rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H2097-2102.
- Rush, J.W., Turk, J.R. & Laughlin, M.H.** Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H1378-1387.
- Rutter, M.K., Meigs, J.B., Sullivan, L.M., D'Agostino, R.B., Sr. & Wilson, P.W.** Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the

- Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2005; 54: 3252-3257.
- Sachidanandam, K., Harris, A., Hutchinson, J. & Ergul, A.** Microvascular versus macrovascular dysfunction in type 2 diabetes: differences in contractile responses to endothelin-1. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006; 231: 1016-1021.
- Salter, K.J. & Kozlowski, R.Z.** Differential electrophysiological actions of endothelin-1 on Cl⁻ and K⁺ currents in myocytes isolated from aorta, basilar and pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284: 1122-1131.
- Sanchez, O., Marcos, E., Perros, F., Fadel, E., Tu, L., Humbert, M., Dartevielle, P., Simonneau, G., Adnot, S. & Eddahibi, S.** Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176: 1041-1047.
- Sanders, K.A. & Hoidal, J.R.** The NOX on pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2007; 101: 224-226.
- Sandler, M.** Is the lung a 'target organ' in diabetes mellitus? *Arch Intern Med*. 1990; 150: 1385-1388.
- Sato, K., Webb, S., Tucker, A., Rabinovitch, M., O'Brien, R.F., McMurtry, I.F. & Stelzner, T.J.** Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 145: 793-797.
- Sato, K., Li, J., Metais, C., Bianchi, C. & Sellke, F.** Increased pulmonary vascular contraction to serotonin after cardiopulmonary bypass: role of cyclooxygenase. *J Surg Res*. 2000; 90: 138-143.
- Satoh, K., Berk, B.C. & Shimokawa, H.** Vascular-derived reactive oxygen species for homeostasis and diseases. *Nitric Oxide*. 25: 211-215.
- Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W. & Grimminger, F.** Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2811-2821.
- Schleinitz, D., Kloting, N., Bottcher, Y., Wolf, S., Dietrich, K., Tonjes, A., Breitfeld, J., Enigk, B., Halbritter, J., Korner, A., Schon, M.R., Jenkner, J., Tseng, Y.H., Lohmann, T., Dressler, M., Stumvoll, M., Bluher, M. & Kovacs, P.** Genetic and evolutionary analyses of the human bone morphogenetic protein receptor 2 (BMP2) in the pathophysiology of obesity. *PLoS One*. 2011, 6: e16155.
- Schmidt, A.M., Hori, O., Chen, J.X., Li, J.F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J. & Stern, D.** Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995; 96: 1395-1403.
- Schulick, A.H., Taylor, A.J., Zuo, W., Qiu, C.B., Dong, G., Woodward, R.N., Agah, R.,**

- Roberts, A.B., Virmani, R. & Dichek, D.A.** Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 6983-6988.
- Shaul, P.W.** Regulation of vasodilator synthesis during lung development. *Early Hum Dev*. 1999; 54: 271-294.
- Shi, Y., So, K.F., Man, R.Y. & Vanhoutte, P.M.** Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol*. 2007; 152: 1033-1041.
- Shi, Y. & Vanhoutte, P.M.** Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 2008; 154: 639-651.
- Shimoda, L.A. & Polak, J.** Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011, 300: C951-967.
- Shimoda, L.A., Sylvester, J.T. & Sham, J.S.** Inhibition of voltage-gated K⁺ current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. *Am J Physiol*. 1998; 274: L842-853.
- Shimoni, Y., Chuang, M., Abel, E.D. & Severson, D.L.** Gender-dependent attenuation of cardiac potassium currents in type 2 diabetic db/db mice. *J Physiol*. 2004; 555: 345-354.
- Shinozaki, K., Kashiwagi, A., Masada, M. & Okamura, T.** Molecular mechanisms of impaired endothelial function associated with insulin resistance. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004; 4: 1-11.
- Simonneau, G., Robbins, I.M., Beghetti, M., Channick, R.N., Delcroix, M., Denton, C.P., Elliott, C.G., Gaine, S.P., Gladwin, M.T., Jing, Z.C., Krowka, M.J., Langleben, D., Nakanishi, N. & Souza, R.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: S43-54.
- Singh, S. & Evans, T.W.** Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J*. 1997; 10: 699-707.
- Smirnov, S.V. & Aaronson, P.I.** Modulatory effects of arachidonic acid on the delayed rectifier K⁺ current in rat pulmonary arterial myocytes. Structural aspects and involvement of protein kinase C. *Circ Res*. 1996; 79: 20-31.
- Song, Y., Jones, J.E., Beppu, H., Keaney, J.F., Jr., Loscalzo, J. & Zhang, Y.Y.** Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Circulation*. 2005; 112: 553-562.
- Song, D., Kuo, K.H., Yao, R., Hutchings, S.R. & Pang, C.C.** Inducible nitric oxide synthase depresses cardiac contractile function in Zucker diabetic fatty rats. *Eur J Pharmacol*. 2008; 579: 253-259.
- Song, D., Yao, R. & Pang, C.C.** Altered vasodilator role of nitric oxide synthase in the

- pancreas, heart and brain of rats with spontaneous type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2008; 591: 177-181.
- Steinberg, H.O. & Baron, A.D.** Insulin-dependent diabetes mellitus and nitrovasodilation. Important and complex interactions. *Circulation.* 1997; 95: 560-561.
- Stepp, D.W. & Frisbee, J.C.** Augmented adrenergic vasoconstriction in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H816-820.
- Steudel, W., Scherrer-Crosbie, M., Bloch, K.D., Weimann, J., Huang, P.L., Jones, R.C., Picard, M.H. & Zapol, W.M.** Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2468-2477.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. & Brand, M.D.** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002; 277: 44784-44790.
- Subramanian, R. & MacLeod, K.M.** Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol.* 2003; 477: 143-152.
- Sugita, H., Fujimoto, M., Yasukawa, T., Shimizu, N., Sugita, M., Yasuhara, S., Martyn, J.A. & Kaneki, M.** Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 14203-14211.
- Sugiura, H. & Ichinose, M.** Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide.* 25: 138-144.
- Sugiura, H., Ichinose, M., Oyake, T., Mashito, Y., Ohuchi, Y., Endoh, N., Miura, M., Yamagata, S., Koarai, A., Akaike, T., Maeda, H. & Shirato, K.** Role of peroxynitrite in airway microvascular hyperpermeability during late allergic phase in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 663-671.
- Sutendra, G., Bonnet, S., Rochefort, G., Haromy, A., Folmes, K.D., Lopaschuk, G.D., Dyck, J.R. & Michelakis, E.D.** Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med.* 2010, 2: 44ra58.
- Sylvester, J.T., Shimoda, L.A., Aaronson, P.I. & Ward, J.P.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev.* 2012, 92: 367-520.
- Takahashi, H., Goto, N., Kojima, Y., Tsuda, Y., Morio, Y., Muramatsu, M. & Fukuchi, Y.** Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290: L450-458.
- Takaya, K., Ogawa, Y., Isse, N., Okazaki, T., Satoh, N., Masuzaki, H., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K. & Nakao, K.** Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225: 75-83.

- Takeda, M., Otsuka, F., Nakamura, K., Inagaki, K., Suzuki, J., Miura, D., Fujio, H., Matsubara, H., Date, H., Ohe, T. & Makino, H.** Characterization of the bone morphogenetic protein (BMP) system in human pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from a sporadic case of primary pulmonary hypertension: roles of BMP type IB receptor (activin receptor-like kinase-6) in the mitotic action. *Endocrinology*. 2004; 145: 4344-4354.
- Taraseviciute, A. & Voelkel, N.F.** Severe pulmonary hypertension in postmenopausal obese women. *Eur J Med Res*. 2006; 11: 198-202.
- Taylor, P.D. & Poston, L.** The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol*. 1994; 113: 801-808.
- Tellier, P.** Aminorex to Fen/Phen: an epidemic foretold. *Circulation*. 1999; 100: e146; author reply e147.
- Thomas, B.J. & Wanstall, J.C.** Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. *Eur J Pharmacol*. 2003; 477: 153-161.
- Thomas, R.J., Palumbo, P.J., Melton, L.J., 3rd, Roger, V.L., Ransom, J., O'Brien, P.C. & Leibson, C.L.** Trends in the mortality burden associated with diabetes mellitus: a population-based study in Rochester, Minn, 1970-1994. *Arch Intern Med*. 2003; 163: 445-451.
- Tiengo, A., Fadini, G.P. & Avogaro, A.** The metabolic syndrome, diabetes and lung dysfunction. *Diabetes Metab*. 2008; 34: 447-454.
- Toblli, J., Cao, G., Rivas, C., Munoz, M., Giani, J., Dominici, F. & Angerosa, M.** Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. *J Hypertens*. 2010; 28: 1007-1019.
- Tortora, G.J., Grabowski, Sandra Reynolds** (2002). Principios de Anatomía Y Fisiología. Paramus, NJ, EUA: Oxford.
- Touyz, R.M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M.T., Pagano, P.J. & Schiffrin, E.L.** Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*. 2002; 90: 1205-1213.
- Tschudi, M.R., Mesaros, S., Luscher, T.F. & Malinski, T.** Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension*. 1996; 27: 32-35.
- Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B. & Voelkel, N.F.** Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 1994; 144: 275-285.
- Tuder, R.M., Cool, C.D., Geraci, M.W., Wang, J., Abman, S.H., Wright, L., Badesch, D. & Voelkel, N.F.** Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with

- severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 1925-1932.
- Tuder, R.M., Yun, J.H., Bhunia, A. & Fijalkowska, I.** Hypoxia and chronic lung disease. *J Mol Med (Berl).* 2007; 85: 1317-1324.
- Tuominen, V.J., Ruotoistenmaki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M. & Isola, J.** ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res.* 2010; 12: R56.
- Turner, N.C. & White, P.** Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 27: 884-890.
- Tyler, R.C., Muramatsu, M., Abman, S.H., Stelzner, T.J., Rodman, D.M., Bloch, K.D. & McMurtry, I.F.** Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1999; 276: L297-303.
- Utkan, T., Sarioglu, Y. & Yildirim, S.** Impaired contraction and relaxation in the aorta of streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology.* 1998; 56: 207-215.
- van den Borst, B., Gosker, H.R., Zeegers, M.P. & Schols, A.M.** Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. *Chest.* 2010; 138: 393-406.
- Vane, J.R. & Botting, R.M.** Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol.* 1995; 75: 3A-10A.
- Vergadi, E., Chang, M.S., Lee, C., Liang, O.D., Liu, X., Fernandez-Gonzalez, A., Mitsialis, S.A. & Kourembanas, S.** Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2011; 123: 1986-1995.
- Vetri, F., Xu, H., Paisansathan, C. & Pelligrino, D.A.** Impairment of neurovascular coupling in type 1 diabetes mellitus in rats is linked to PKC modulation of BKCa and Kir channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012, 302: H1274-1284.
- Villalba, N., Martinez, P., Briones, A.M., Sanchez, A., Salaices, M., Garcia-Sacristan, A., Hernandez, M., Benedito, S. & Prieto, D.** Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H696-707.
- Villamor, E., Ruiz, T., Perez-Vizcaino, F., Tamargo, J. & Moro, M.** Endothelium-derived nitric oxide-dependent response to hypoxia in piglet intrapulmonary arteries. *Biol Neonate.* 1997; 72: 62-70.
- Villamor, E., Ruijtenbeek, K., Pulgar, V., De Mey, J.G. & Blanco, C.E.** Vascular reactivity in intrapulmonary arteries of chicken embryos during transition to ex ovo life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R917-927.
- Vracko, R., Thorning, D. & Huang, T.W.** Basal lamina of alveolar epithelium and capillaries:

- quantitative changes with aging and in diabetes mellitus. *Am Rev Respir Dis.* 1979; 120: 973-983.
- Wang, H., Jiang, Y.W., Zhang, W.J., Xu, S.Q., Liu, H.L., Yang, W.Y. & Lou, J.N.** Differential activations of PKC/PKA related to microvasculopathy in diabetic GK rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011, 302: E173-182.
- Wang, S.N., Lapage, J. & Hirschberg, R.** Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2392-2399.
- Watts, I.S., Zakrzewski, J.T. & Bakhle, Y.S.** Altered prostaglandin synthesis in isolated lungs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Thromb Res.* 1982; 28: 333-342.
- Waypa, G.B., Chandel, N.S. & Schumacker, P.T.** Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res.* 2001; 88: 1259-1266.
- Waypa, G.B. & Schumacker, P.T.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol.* 2005; 98: 404-414.
- Weir, E.K., Reeve, H.L., Huang, J.M., Michelakis, E., Nelson, D.P., Hampl, V. & Archer, S.L.** Anorexic agents aminorex, fenfluramine, and dexfenfluramine inhibit potassium current in rat pulmonary vascular smooth muscle and cause pulmonary vasoconstriction. *Circulation.* 1996; 94: 2216-2220.
- Weissmann, N., Tadic, A., Hanze, J., Rose, F., Winterhalder, S., Nollen, M., Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Seeger, W. & Grimminger, F.** Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L683-690.
- Weissmann, N., Zeller, S., Schafer, R.U., Turowski, C., Ay, M., Quanz, K., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Fink, L., Seeger, W. & Grimminger, F.** Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 34: 505-513.
- Weitzberg, E., Lundberg, J.M. & Rudehill, A.** Inhibitory effects of diclofenac on the endotoxin shock response in relation to endothelin turnover in the pig. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995; 39: 50-59.
- White, V., Capobianco, E., Higa, R., Martinez, N., Sosa, M., Pustovrh, M.C. & Jawerbaum, A.** Increased nitration and diminished activity of copper/zinc superoxide dismutase in placentas from diabetic rats. *Free Radic Res.* 2010, 44: 1407-1415.
- Wideman, R.F., Jr. & Hamal, K.R.** Idiopathic pulmonary arterial hypertension: an avian model for plexogenic arteriopathy and serotonergic vasoconstriction. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011, 63: 283-295.
- Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., van den Enden, M., Kilo, C. & Tilton, R.G.** Hyperglycemic pseudohypoxia and

- diabetic complications. *Diabetes*. 1993; 42: 801-813.
- Xie, Q. & Nathan, C.** The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 1994; 56: 576-582.
- Xu, B., Chibber, R., Ruggiero, D., Kohner, E., Ritter, J. & Ferro, A.** Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*. 2003; 17: 1289-1291.
- Xu, S., Ying, J., Jiang, B., Guo, W., Adachi, T., Sharov, V., Lazar, H., Menzoian, J., Knyushko, T.V., Bigelow, D., Schoneich, C. & Cohen, R.A.** Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H2220-2227.
- Xu, W., Koeck, T., Lara, A.R., Neumann, D., DiFilippo, F.P., Koo, M., Janocha, A.J., Masri, F.A., Arroliga, A.C., Jennings, C., Dweik, R.A., Tudor, R.M., Stuehr, D.J. & Erzurum, S.C.** Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 1342-1347.
- Yamagishi, S., Maeda, S., Matsui, T., Ueda, S., Fukami, K. & Okuda, S.** Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1820: 663-671.
- Yang, J., Pollock, J.S. & Carmines, P.K.** NADPH oxidase and PKC contribute to increased Na transport by the thick ascending limb during type 1 diabetes. *Hypertension*. 2012, 59: 431-436.
- Yang, X., Castilla, L.H., Xu, X., Li, C., Gotay, J., Weinstein, M., Liu, P.P. & Deng, C.X.** Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*. 1999; 126: 1571-1580.
- Yang, X., Sheares, K.K., Davie, N., Upton, P.D., Taylor, G.W., Horsley, J., Wharton, J. & Morrell, N.W.** Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 27: 688-696.
- Yang, X., Long, L., Southwood, M., Rudarakanchana, N., Upton, P.D., Jeffery, T.K., Atkinson, C., Chen, H., Trembath, R.C. & Morrell, N.W.** Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*. 2005; 96: 1053-1063.
- Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J.A. & Kaneki, M.** S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem*. 2005; 280: 7511-7518.
- Yeh, C.H., Chang, C.K., Cheng, M.F., Lin, H.J. & Cheng, J.T.** Decrease of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and its type II receptor (BMP-RII) in kidney of type 1-like diabetic rats. *Horm Metab Res*. 2009; 41: 605-611.
- Yip, J., Facchini, F.S. & Reaven, G.M.** Resistance to insulin-mediated glucose disposal as a

- predictor of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 2773-2776.
- Yu, P.B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E. & Bloch, K.D.** Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 24443-24450.
- Yuan, X.J., Tod, M.L., Rubin, L.J. & Blaustein, M.P.** Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol.* 1990; 259: H281-289.
- Yuan, X.J., Goldman, W.F., Tod, M.L., Rubin, L.J. & Blaustein, M.P.** Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol.* 1993; 264: L116-123.
- Yuan, X.J., Tod, M.L., Rubin, L.J. & Blaustein, M.P.** NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca^{2+} concentration by activating voltage-gated K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 10489-10494.
- Yuan, J.X., Aldinger, A.M., Juhaszova, M., Wang, J., Conte, J.V., Jr., Gaine, S.P., Orens, J.B. & Rubin, L.J.** Dysfunctional voltage-gated K^{+} channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 1998; 98: 1400-1406.
- Yuhki, K.I., Miyauchi, T., Kakinuma, Y., Murakoshi, N., Maeda, S., Goto, K., Yamaguchi, I. & Suzuki, T.** Endothelin-1 production is enhanced by rotenone, a mitochondrial complex I inhibitor, in cultured rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 38: 850-858.
- Zamanian, R.T., Hansmann, G., Snook, S., Lilienfeld, D., Rappaport, K.M., Reaven, G.M., Rabinovitch, M. & Doyle, R.L.** Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2009; 33: 318-324.
- Zanetti, M., Barazzoni, R., Stebel, M., Roder, E., Biolo, G., Baralle, F.E., Cattin, L. & Guarnieri, G.** Dysregulation of the endothelial nitric oxide synthase-soluble guanylate cyclase pathway is normalized by insulin in the aorta of diabetic rat. *Atherosclerosis.* 2005; 181: 69-73.
- Zemel, M.B., Reddy, S. & Sowers, J.R.** Insulin attenuation of vasoconstrictor responses to phenylephrine in Zucker lean and obese rats. *Am J Hypertens.* 1991; 4: 537-539.
- Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D.D., Yi, E.S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P.A., Kriett, J.M., Yung, G., Rubin, L.J. & Yuan, J.X.** Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285: L740-754.
- Zocratoa L., Capettinia L., Rezendea B.A., Silvaa J.F.,Rodrigues-Machadoa M.G., Cortesb S.F., Lemos V.S.** Increased expression of endothelial iNOS accounts for hyporesponsiveness of pulmonary artery to vasoconstrictors after paraquat poisoning. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(3):1019-25.

- Zoer, B., Cogolludo, A.L., Perez-Vizcaino, F., De Mey, J.G., Blanco, C.E. & Villamor, E.** Hypoxia sensing in the fetal chicken femoral artery is mediated by the mitochondrial electron transport chain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010, 298: R1026-1034.
- Zou, M.H., Shi, C. & Cohen, R.A.** Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002; 109: 817-826.
- Zucker, T.P., Bonisch, D., Hasse, A., Grosser, T., Weber, A.A. & Schror, K.** Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E1 in coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1998; 345: 213-220.

ANEXO
(PUBLICACIONES)

Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction

Jose G. Lopez-Lopez,¹ Javier Moral-Sanz,² Giovanna Frazziano,² Maria J. Gomez-Villalobos,¹ Jorge Flores-Hernandez,¹ Eduardo Monjaraz,¹ Angel Cogolludo,² and Francisco Perez-Vizcaino²

¹Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico; and ²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense Madrid and Ciber Enfermedades Respiratorias (CibeRes), Madrid, Spain

Submitted 18 June 2008; accepted in final form 18 August 2008

Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L727–L732, 2008. First published August 22, 2008; doi:10.1152/ajplung.90354.2008.—Recent data suggest that diabetes is a risk factor for pulmonary hypertension. The aim of the present study was to analyze whether diabetes induces endothelial dysfunction in pulmonary arteries and the mechanisms involved. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control (saline) and a diabetic group (70 mg/kg⁻¹ streptozotocin). After 6 wk, intrapulmonary arteries were mounted for isometric tension recording, and endothelial function was tested by the relaxant response to acetylcholine. Protein expression and localization were measured by Western blot and immunohistochemistry and superoxide production by dihydroethidium staining. Pulmonary arteries from diabetic rats showed impaired relaxant response to acetylcholine and reduced vasoconstrictor response to the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME, whereas the response to nitroprusside and the expression of endothelial NO synthase remained unchanged. Endothelial dysfunction was reversed by addition of superoxide dismutase or the NADPH oxidase inhibitor apocynin. An increase in superoxide production and increased expression of the NADPH oxidase regulatory subunit p47^{phox} were also found in pulmonary arteries from diabetic rats. In conclusion, the pulmonary circulation is a target for diabetes-induced endothelial dysfunction via enhanced NADPH oxidase-derived superoxide production.

pulmonary arteries; superoxide; nitric oxide; streptozotocin

TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES are associated with an increased risk of microvascular and macrovascular complications, including nephropathy, retinopathy, systemic hypertension, and atherosclerosis (23). Despite this association with systemic cardiovascular disease, until recently, diabetes had not been implicated as a risk factor in pulmonary arterial hypertension (PAH), a syndrome that in its most severe form (idiopathic PAH) is a rare but incurable disease leading to progressive right heart failure and death (9, 14). However, some recent data suggest a link between diabetes, especially type 2 diabetes, and PAH. Thus, patients with diabetes mellitus type 2 have significantly higher prevalence of PAH that is independent of coronary artery disease, hypertension, congestive heart failure, or smoking (21). PAH was also more severe in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) plus diabetes mellitus type 2 compared with patients with only COPD (19). In addition, maternal diabetes (either type 1 or type 2) is an

independent risk factor for persistent pulmonary hypertension of the newborn (13). There is also some experimental evidence linking type 1 and type 2 diabetes with pulmonary hypertension. Thus, male apoE^{-/-} mice on a high-fat diet, an animal model of insulin resistance and metabolic syndrome, develop PAH (12). Right ventricular hypertrophy, suggestive of PAH, has been found in rats treated with streptozotocin, a model of type 1 diabetes (1).

Endothelial dysfunction, classically characterized by a reduced capacity of endothelial cells to induce vasodilatation via the release of nitric oxide (NO), is an early and independent predictor of poor prognosis in most forms of cardiovascular disease (25, 29), including PAH (2, 7), and also in COPD (3). A considerable body of evidence in humans indicates that endothelial dysfunction is a key factor in the development of diabetic retinopathy, nephropathy, and atherosclerosis in both type 1 and type 2 diabetes (15, 26, 30). The signaling pathway of NO, cGMP, and cGMP-dependent protein kinase has been shown to be downregulated under diabetic conditions and contributes to the development of diabetic vascular complications (6, 31, 32).

In the present study, we have characterized the effects of type 1 diabetes on pulmonary arteries. We demonstrate for the first time that diabetes induces endothelial dysfunction in pulmonary arteries, an effect that might explain a higher incidence of PAH in diabetic patients. Moreover, we show that diabetes-induced endothelial dysfunction is due to an upregulation of NADPH oxidase and the subsequent increase in superoxide (O₂⁻), leading to a reduction in the bioavailability of NO.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental groups. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication No. 85-23, revised 1996), and the procedures were approved by our institutional review board. Male Sprague-Dawley rats (150–200 g) were randomly divided into a control and a diabetic group. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 70 mg/kg⁻¹ streptozotocin (controls were injected with saline) and followed for 6 wk. Hyperglycemia (>350 mg/dl) in the diabetic rats was confirmed using a OneTouch Ultra glucometer.

Vascular reactivity studies. Intrapulmonary artery rings (2–3 mm long, internal diameter ~0.5–0.8 mm) were dissected and mounted under 0.75 g of resting tension in organ chambers as previously described (8). After equilibration, rings were precontracted by 1

Address for reprint requests and other correspondence: F. Perez-Vizcaino, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain (e-mail: fperez@med.ucm.es).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

$\mu\text{mol/l}$ phenylephrine, and concentration-response curves to acetylcholine (ACh; 1 nmol/l–100 $\mu\text{mol/l}$) or sodium nitroprusside (0.1 nmol/l–30 $\mu\text{mol/l}$ in the dark) were performed by cumulative addition in the absence or presence of the NO synthase (NOS) inhibitor L-NAME (100 $\mu\text{mol/l}$), superoxide dismutase (SOD; 100 U/ml), or the NADPH oxidase inhibitor apocynin (300 $\mu\text{mol/l}$). In some rings, a concentration-response curve to phenylephrine (1 nmol/l–30 $\mu\text{mol/l}$) was carried out by cumulative addition of the drug.

Western blot analysis. Pulmonary artery or whole lung homogenates were run on a SDS-PAGE, and Western blot was performed as described (18) using primary monoclonal mouse anti-eNOS (Transduction Laboratories, San Diego, CA), anti-SOD-1 antibodies (Stress-Gen, Victoria, Canada), polyclonal rabbit anti-p47^{phox} antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and mouse anti- α - or anti- β -actin (Sigma, Tres Cantos, Madrid).

In situ detection of vascular superoxide production. Unfixed pulmonary rings were cryopreserved, included in OCT, frozen, and cut into 20- μm cross sections as described (8). Sections were incubated for 30 min in HEPES-buffered solution containing dihydroethidium (10 $\mu\text{mol/l}$), counterstained with the nuclear stain DAPI, and photographed. Fluorescence was quantified using ImageJ (version 1.32j, National Institutes of Health). Superoxide production was estimated from the ratio of ethidium:DAPI fluorescence (18).

Immunohistochemistry. Sections (20 μm) of pulmonary arteries were prepared as described above for dihydroethidium fluorescence and fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h, and immunohistochemistry was performed as described (18).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SE of measurements. Statistical analysis was performed by comparing the control and diabetic groups with an unpaired Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Individual cumulative concentration-response curves were fitted to a logistic equation. The maximal drug effect (E_{max}) and the negative log molar drug concentration producing 50% of the E_{max} (pD_2) were calculated from the fitted curves for each ring.

RESULTS

Endothelial dysfunction in diabetic pulmonary arteries. Stimulation of pulmonary artery rings with 80 mmol/l KCl results in a contractile response that is usually regarded as indicative of the smooth muscle contractile capacity. This response was similar in pulmonary artery rings from control and diabetic rats (374 ± 14 and 373 ± 94 mg, respectively). After washing KCl, a cumulative concentration-response curve to the α -adrenoceptor agonist phenylephrine showed an increased maximal response in the diabetic group compared with the control one (Fig. 1A, E_{max} 106 ± 6 vs. $83 \pm 7\%$ of the response to KCl) without changes in the concentration of the vasoconstrictor required for half-maximal activation (pD_2 values 7.40 ± 0.25 vs. 7.37 ± 0.10 , respectively). In rings preconstricted with phenylephrine (100 nmol/l, i.e., ~ 60 – 75% of its maximal response), increasing concentrations of ACh induced a relaxant response that is considered as an index of endothelial function. This relaxant response was dramatically reduced in pulmonary arteries from diabetic rats compared with controls (Fig. 1B). The analysis of the concentration-response curve indicated that diabetes induced a change in the maximal relaxant response (E_{max} values were $71 \pm 5\%$ and $34 \pm 6\%$ in the control and diabetic group, respectively, $P < 0.01$) without significant changes in the concentration of ACh required for half-maximal relaxation (pD_2 6.28 ± 0.10 vs. 6.38 ± 0.11 , respectively).

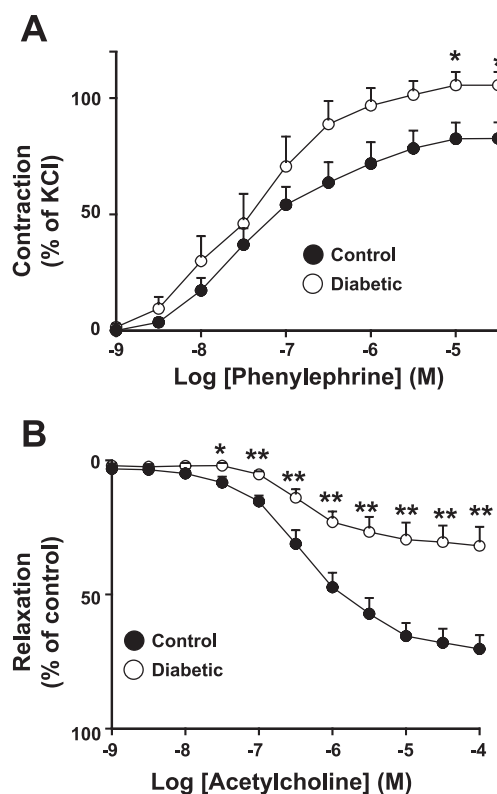


Fig. 1. Diabetes-induced endothelial dysfunction. A: vasoconstrictor responses to phenylephrine and vasodilator responses to acetylcholine (B) in pulmonary arteries from control and diabetic rats. Responses to acetylcholine were analyzed in arteries stimulated with phenylephrine (100 nmol/l). Results are expressed as means \pm SE ($n = 6$ and 5 in control and diabetic, respectively, in A and $n = 13$ and 12, respectively, in B). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. control rings.

NO dependence. The relaxant response induced by ACh was fully inhibited by the NOS inhibitor L-NAME in both groups (Fig. 2A). These results suggest that the NO pathway is impaired in the diabetic animals. Moreover, the NOS inhibitor L-NAME induced a significant contraction in pulmonary arteries from control rats that was negligible in the diabetic animals (Fig. 2B). These results indicate that, in control animals, there is a basal NO synthesis regulating pulmonary artery tone that is absent in the diabetic animals. To analyze whether the impaired response to endothelial-derived NO is due to a reduced bioavailable NO or due to a defect in the signaling of NO in vascular smooth muscle, we analyzed the effects of nitroprusside, which directly activates soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle, mimicking the effects of endogenous NO. The relaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator nitroprusside was not different between groups (Fig. 2C). To analyze the possible role of changes in endothelial NOS (eNOS), its expression was analyzed in lung homogenates by Western blot. The expression of this enzyme was similar in diabetic compared with control rat lungs (Fig. 2D).

Role of superoxide. We analyzed the relaxant response of ACh in pulmonary arteries treated with SOD. SOD produced an increase in the relaxant response of ACh, with this effect much more marked in the diabetic compared with the control arteries (Fig. 3A). Therefore, in the presence of SOD, the

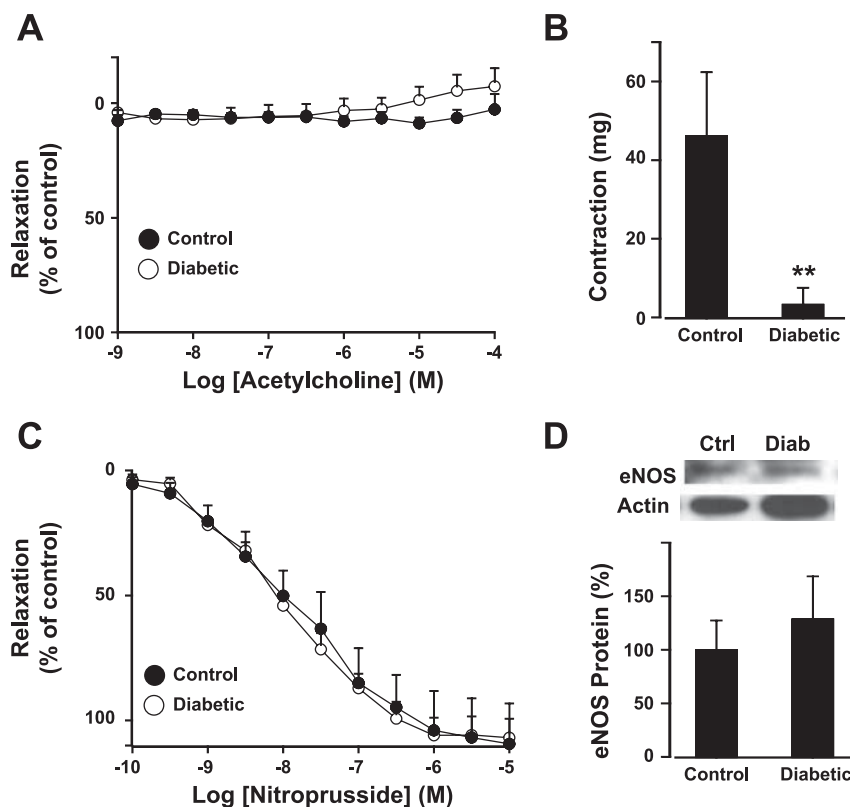


Fig. 2. Role of nitric oxide (NO). *A*: inhibitory effects of the NO synthase inhibitor L-NAME (100 μ mol/l) on acetylcholine-induced relaxation in arteries from control and diabetic rats stimulated with phenylephrine (100 nmol/l). *B*: contractile responses induced by L-NAME (100 μ mol/l). *C*: sodium nitroprusside-induced relaxation in arteries stimulated with phenylephrine (100 nmol/l). *D*: expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in lung homogenates analyzed by Western blot. Densitometric values were normalized to β -actin and presented as a percentage of values in control group. Results are expressed as means \pm SE ($n = 7$ and 6, control and diabetic, respectively, in *A*, *B*, and *C*, and $n = 6$ and 5, respectively, in *D*). ** $P < 0.01$ vs. control rings.

maximal relaxant responses to ACh were not significantly different in control and diabetic rats ($E_{\max} = 91 \pm 5\%$ and $83 \pm 4\%$, respectively). To characterize and localize superoxide production within the vascular wall, ethidium red fluorescence was analyzed in sections of pulmonary arteries incubated with dihydroethidium. Dihydroethidium is oxidized by superoxide to yield ethidium, which stains DNA. Positive red staining, indicative of superoxide production, was quantified and normalized to the blue fluorescence of the nuclear stain DAPI, allowing comparisons between different sections. Rings from diabetic rats showed a marked increased staining in adventitial, medial, and endothelial cells compared with control (Fig. 3*B*). We also determined whether there were changes in the expression of SOD-1, the main lung antioxidant enzyme responsible for superoxide clearance. Paradoxically, SOD-1 expression was increased in pulmonary arteries from diabetic rats (Fig. 3*C*).

Role of NADPH oxidase. To analyze a possible role of NADPH oxidase, we tested the effects of apocynin, an inhibitor of this superoxide-generating complex, on the relaxant response of ACh in pulmonary arteries. As shown with SOD, apocynin also produced a marked increase in the relaxant response of ACh, again with this effect much more marked in the diabetic compared with the control arteries (Fig. 4*A*, $108 \pm 2\%$ and $E_{\max} = 94 \pm 4\%$, respectively). Therefore, we analyzed the expression of p47^{phox}, the regulatory subunit of NADPH oxidase in pulmonary arteries from control and diabetic rats. Figure 4*B* shows that this NADPH oxidase subunit was markedly increased in the vessels of diabetic compared with control rats. Likewise, a strong increase in p47^{phox} immunostaining was observed in the adventitia and in the media in sections of pulmonary arteries (Fig. 4*C*).

DISCUSSION

Herein we show that treatment with streptozotocin, an established model for type 1 diabetes, induced endothelial dysfunction in rat pulmonary arteries. This effect was associated with a reduced vasoconstrictor response to the NOS inhibitor L-NAME, whereas the response to nitroprusside and the expression of eNOS remained unchanged. Endothelial function was restored by addition of SOD or the NADPH oxidase inhibitor apocynin. An increase in superoxide production and increased expression of the NADPH oxidase regulatory subunit p47^{phox} was also found in pulmonary arteries from diabetic rats.

In pulmonary arteries from animals and humans, NO is the major vasoactive factor accounting for endothelium-dependent relaxation (16, 28). Likewise, in the present study, ACh-induced pulmonary artery relaxation in both control and diabetic rats was entirely dependent on endothelium-derived NO because it was abolished by L-NAME. Thus, the diminished ACh-induced relaxation indicates an impaired agonist-induced NO bioactivity. The impairment of the NO pathway for pulmonary artery relaxation is further supported by the lack of a contractile response induced by L-NAME in diabetic rats. Thus, not only agonist-induced but also basal NO bioactivity was impaired in diabetic pulmonary arteries.

Endothelium-dependent relaxation requires 1) Ca^{2+} -dependent activation of eNOS in endothelial cells leading to NO synthesis, 2) NO diffusion to the adjacent smooth muscle cells, 3) NO-induced activation of soluble guanylyl cyclase leading to cyclic GMP synthesis, and 4) activation of protein kinase G. All these steps in the signaling pathway of NO in systemic vessels have been reported to be impaired by high glucose in

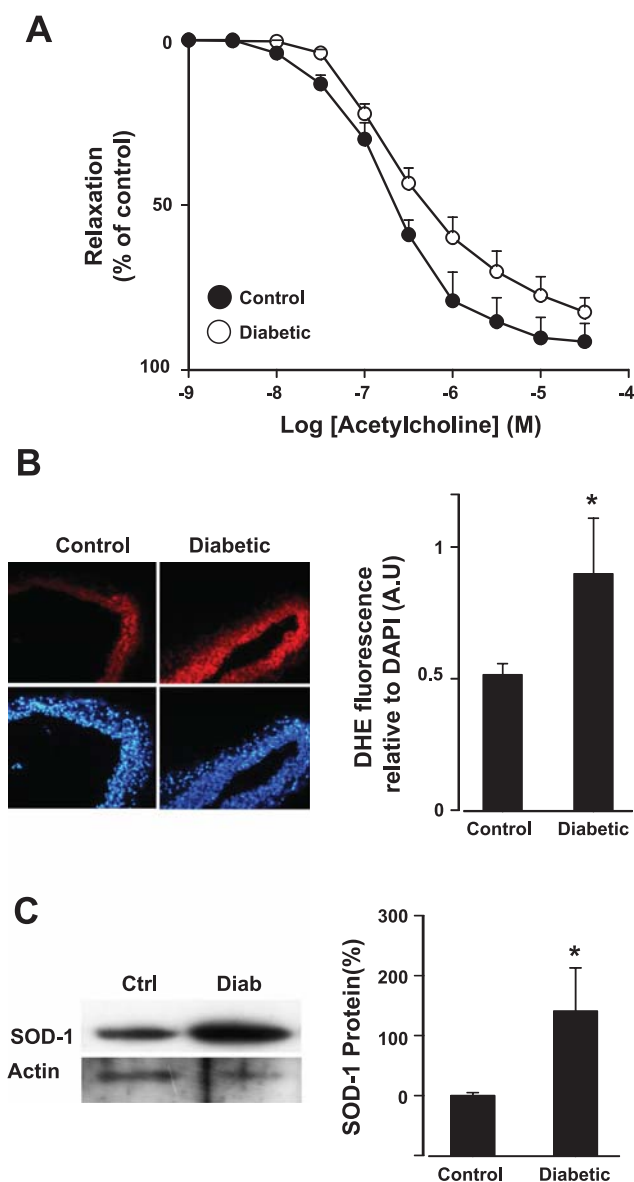


Fig. 3. Role of superoxide. **A**: effects of preincubation with superoxide dismutase (SOD; 100 U/ml) on endothelial dysfunction. Acetylcholine-induced relaxation was analyzed in arteries from control and diabetic rats stimulated with phenylephrine (100 nmol/l). **B**: superoxide production in pulmonary arteries. *Top*: shows arteries incubated in the presence of dihydroethidium, which produces a red fluorescence when oxidized to ethidium by superoxide. *Bottom*: shows blue fluorescence of the nuclear stain DAPI ($\times 400$ magnification). *Right*: averaged values of red ethidium fluorescence normalized to blue DAPI. **C**: expression of SOD-1 in pulmonary artery homogenates analyzed by Western blot. Densitometric values were normalized to α -actin and presented as a percentage of values in control group. Results are expressed as means \pm SE ($n = 5$ and 7 , control and diabetic, respectively, in **A**, $n = 6$ and 5 , respectively, in **B**, and $n = 6$ and 5 , respectively, in **C**). $*P < 0.05$ vs. control rings.

in vitro studies and/or in type 1 and type 2 diabetes (15, 26, 30, 31, 32). In the present study, the relaxant response to the activator of soluble guanylyl cyclase nitroprusside was similar in control and diabetic rats, indicating that alterations in the latter two steps mentioned above do not seem to contribute to diabetes-induced endothelial dysfunction in pulmonary arteries. On the other hand, changes in the expression of eNOS in

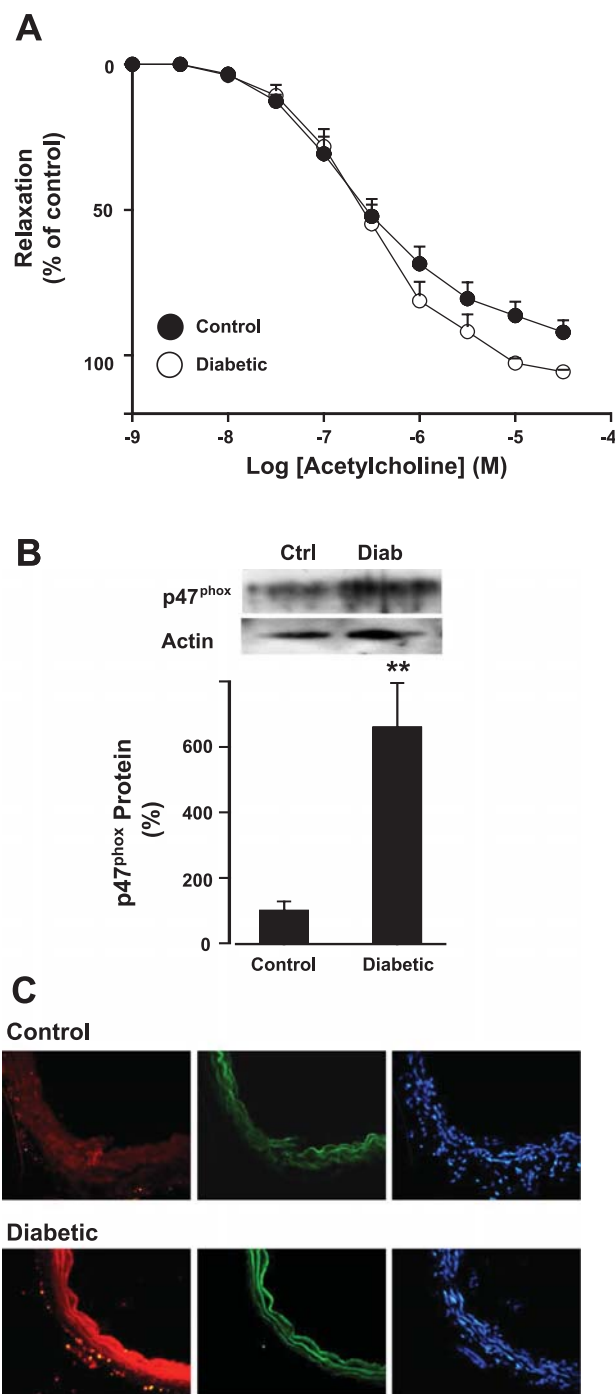


Fig. 4. Role of NADPH oxidase. **A**: effects of preincubation with the NADPH oxidase inhibitor apocynin (300 μ mol/l) on endothelial dysfunction. Acetylcholine-induced relaxation was analyzed in arteries from control and diabetic rats stimulated with phenylephrine (100 nmol/l). **B**: expression of p47^{phox} in pulmonary artery homogenates analyzed by Western blot. Densitometric values were normalized to α -actin and presented as a percentage of values in control group. **C**: immunohistochemical localization of p47^{phox}. Shown are p47^{phox} protein (red fluorescence, *left*), elastin (green autofluorescence, *middle*), and nuclei (blue fluorescence of the nuclear stain DAPI, *right*). Images ($\times 400$ magnification) are representative of 10–12 sections from 4 different pulmonary arteries. Results are expressed as means \pm SE ($n = 6$ and 5 , control and diabetic, respectively, in **A** and $n = 5$ in **B**). $**P < 0.05$ vs. control rings.

experimental models of diabetes are controversial. Thus both increased and decreased expression of eNOS in different systemic vessels has been reported in the same model used herein (22, 32). Our data show that in the pulmonary arteries, there is no significant change in eNOS expression, ruling out that deficient eNOS protein might account for endothelial dysfunction.

One of the key mechanisms of endothelial dysfunction involves the vascular production of reactive oxygen species, particularly superoxide, which reacts rapidly with and inactivates NO (27). Endothelial dysfunction associated with both diabetes and PAH has been reported to involve the vascular production of superoxide, which reacts rapidly with NO, limiting its diffusion (5, 7, 27). Dihydroethidium staining indicated a marked increase in superoxide production in pulmonary arteries from diabetic rats. The fact that in the diabetic pulmonary arteries the impaired relaxant response to ACh was significantly rescued by SOD, the main physiological scavenger of superoxide, indicates a functional role of the increased superoxide on diabetes-induced endothelial dysfunction. The expression of the Cu/Zn-SOD (SOD-1) has been reported to be reduced in aortae and in the liver from streptozotocin-treated rats (20, 24), which suggested that the increased superoxide was attributable, at least in part, to a reduced Cu/Zn-SOD activity. In sharp contrast, we found that SOD-1 was increased in diabetic pulmonary arteries. A similar finding was reported in mesenteric arteries from streptozotocin-treated rats, perhaps reflecting a compensatory response to the increase in oxidative stress (10).

The NADPH oxidase, a multi-enzymatic complex formed by gp91^{phox} or its vascular analogous nox-1 and nox-4, rac, p22^{phox}, p47^{phox}, and p67^{phox}, is considered to be the most important source of superoxide in the vessel wall. Furthermore, the expression and activity of this complex are increased in patients with endothelial dysfunction, atherosclerosis, and other cardiovascular risk factors. Accumulating evidence suggests that increased vascular expression of NADPH oxidase subunit proteins induced by high glucose in vitro or in diabetes and PAH plays an important role in development of endothelial dysfunction (4, 11, 17). To analyze whether upregulation of NADPH oxidase might account for endothelial dysfunction in diabetic pulmonary arteries, we analyzed the expression of the NADPH oxidase regulatory subunit p47^{phox}. We found a marked increase in the expression of this subunit both by Western blot and immunohistochemical analysis. The functional role of the upregulated NADPH oxidase was confirmed by the restoration of endothelial function by the inhibitor of this enzymatic complex apocynin.

The development of PAH and right ventricular hypertrophy reported in insulin-resistant male apoE^{-/-} mice (12) is consistent with the epidemiological data linking type 2 diabetes and PAH (13, 19, 21). In the same model of type 1 diabetes as used herein, right ventricular hypertrophy was also observed (1). The impairment of the pulmonary vascular function described in the present paper further supports that type 1 diabetes is also associated with pulmonary vascular dysfunction.

In conclusion, our present results demonstrate that the pulmonary circulation is also a target for diabetes-induced damage via enhanced NADPH oxidase-derived superoxide and add

experimental support for the recently reported association between diabetes and PAH.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Manuel Bas for excellent technical assistance.

GRANTS

This work was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF2005-03770, SAF2008-03948, and AGL2007-66108) and Mutua Madrileña.

REFERENCES

1. Al-Shafei AI, Wise RG, Gresham GA, Bronns G, Carpenter TA, Hall LD, Huang CL. Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *J Physiol* 538: 541–553, 2002.
2. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. Circulating endothelial microparticles levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1268–1275, 2008.
3. Barbera JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, Wiggs BR, Rodriguez-Roisin R. Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 423–429, 1994.
4. Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA, Black SM. Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res* 92: 683–691, 2003.
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820, 2001.
6. Chang S, Hypolite JA, Velez M, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase-1 activity in the corpus cavernosum smooth muscle of diabetic rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R950–R960, 2004.
7. Coggins MP, Bloch KD. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1877–1885, 2007.
8. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeño L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* 98: 931–938, 2006.
9. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT. Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a natural prospective registry. *Ann Intern Med* 115: 343–349, 1991.
10. Ding H, Hashem M, Trigg C. Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *Eur J Pharmacol* 561: 121–128, 2007.
11. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105: 1656–1662, 2002.
12. Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, Rabinovitch M. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Circulation* 115: 1275–1284, 2007.
13. Hernandez-Diaz S, Van Marter LJ, Werler MM, Louik C, Mitchell AA. Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 120: e272–e282, 2007.
14. Humbert M. Update in pulmonary arterial hypertension 2007. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 574–579, 2008.
15. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 40: 183–192, 2006.
16. Lawrence RN, Clelland C, Beggs D, Salama FD, Dunn WR, Wilson VG. Differential role of vasoactive prostanoids in porcine and human isolated pulmonary arteries in response to endothelium-dependent relaxants. *Br J Pharmacol* 125: 1128–1137, 1998.
17. Liu S, Ma X, Gong M, Shi L, Lincoln T, Wang S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular

- smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 42: 852–863, 2007.
18. **Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, Moreno L, Coviello A, Peral De Bruno M, Vera R, Galisteo M, Jiménez R, Tamargo J, Perez-Vizcaino F.** Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 544: 97–103, 2006.
 19. **Makarevich AE, Valevich VE, Pochtavtsev AU.** Evaluation of pulmonary hypertension in COPD patients with diabetes. *Adv Med Sci* 52: 265–272, 2007.
 20. **Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K.** Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 42: 993–1007, 2007.
 21. **Movahed M, Hashemzadhem M, Jamal MM.** The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients With type II diabetes mellitus. *Chest* 128: 3568–3571, 2005.
 22. **Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM.** Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2144–H2152, 2005.
 23. **Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino Sr RB, Wilson PW.** Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 54: 3252–3257, 2005.
 24. **Sadi G, Yilmaz O, Güray T.** Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol Cell Biochem* 309: 109–116, 2008.
 25. **Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM.** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899–1906, 2000.
 26. **Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW.** Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 34: 55–68, 1997.
 27. **Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF, Malinski T.** Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27: 32–35, 1996.
 28. **Villamor E, Ruijtenbeek K, Pulgar V, De Mey JG, Blanco CE.** Vascular reactivity in intrapulmonary arteries of chicken embryos during transition to ex ovo life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R917–R927, 2002.
 29. **Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA.** The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 42: 114911–114960, 2003.
 30. **Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA.** Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 27: 567–574, 1996.
 31. **Xu B, Chibber R, Ruggerio D, Kohner E, Ritter J, Ferro A.** Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J* 17: 1289–1291, 2003.
 32. **Zanetti M, Barazzoni R, Stebel M, Roder E, Biolo G, Baralle FE, Cattin L, Guarnieri G.** Dysregulation of the endothelial nitric oxide synthase-soluble guanylate cyclase pathway is normalized by insulin in the aorta of diabetic rat. *Atherosclerosis* 181: 69–73, 2005.



Type 1 Diabetes-Induced Hyper-Responsiveness to 5-Hydroxytryptamine in Rat Pulmonary Arteries via Oxidative Stress and Induction of Cyclooxygenase-2

Jose G. Lopez-Lopez, Javier Moral-Sanz, Giovanna Frazziano, Maria J. Gomez-Villalobos, Laura Moreno, Carmen Menendez, Jorge Flores-Hernandez, Jose A. Lorente, Angel Cogolludo, and Francisco Perez-Vizcaino

Instituto de Fisiologia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico (J.G.L.-L., M.J.G.-V., J.F.-H.); Departamento de Farmacologia, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain (J.M.-S., G.F., L.M., C.M., A.C., F.P.-V.); Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Spain (J.A.L.); and Ciber Enfermedades Respiratorias, Bunyola, Spain (J.M.-S., G.F., L.M., C.M., J.A.L., A.C., F.P.-V.)

Received January 17, 2011; accepted April 25, 2011

ABSTRACT

Recent epidemiological data suggest that diabetes is a risk factor for pulmonary arterial hypertension. The aim of the present study was to analyze the link between type 1 diabetes and pulmonary arterial dysfunction in rats. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group (saline) and a diabetic group (70 mg/kg streptozotocin). After 6 weeks, diabetic animals showed a down-regulation of the lung bone morphogenetic protein receptor type 2, up-regulation of 5-hydroxytryptamine (5-HT) 2A receptors and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins as measured by Western blot analysis, and increased contractile responses to 5-HT in isolated intrapulmonary arteries. The hyper-responsiveness to 5-HT was endothelium-independent and unaffected by inhibition of nitric-oxide synthase

but prevented by indomethacin, the selective COX-2 inhibitor *N*-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methane sulfonamide (NS-398), superoxide dismutase, and the NADPH oxidase inhibitor apocynin or chronic treatment with insulin. However, diabetic rats at 6 weeks did not develop elevated right ventricular pressure or pulmonary artery muscularization, whereas a longer exposure (4 months) to diabetes induced a modest, but significant, increase in right ventricular systolic pressure. In conclusion, type 1 diabetes mellitus in rats induces a number of changes in lung protein expression and pulmonary vascular reactivity characteristic of clinical and experimental pulmonary arterial hypertension but insufficient to elevate pulmonary pressure. Our results further strengthen the link between diabetes and pulmonary arterial hypertension.

Introduction

Despite the fact that type 1 and type 2 diabetes are strongly associated with systemic cardiovascular diseases (Rutter et al., 2005) the relationship with pulmonary vascular disease has been almost disregarded (Fouty, 2008). However, epidemiological studies suggest a link between diabetes and pulmonary arterial hypertension (PAH) (Movahed et al.,

2005; Makarevich et al., 2007; Zamanian et al., 2009). In addition, maternal diabetes is an independent risk factor for persistent pulmonary hypertension of the newborn (Hernandez-Diaz et al., 2007). There is also some experimental evidence linking type 2 diabetes with PAH. Thus, male ApoE(–/–) mice on a high-fat diet, an animal model associated to insulin resistance, developed PAH that was prevented by the antidiabetic drug rosiglitazone (Hansmann et al., 2007).

PAH exhibits a complex pathophysiology, unlikely to be explained by a single factor (Chan and Loscalzo, 2008; Rabinovitch, 2008). Mutations in bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) underlie many heritable and sporadic cases of PAH (International PPH Consortium, et al.,

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación [Grants SAF2008-03948, SAF2010-22066-C02-02, AGL2007-66108] and Mutua Madrileña.

J.G.L.-L. and J.M.-S. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.111.179515.

ABBREVIATIONS: PAH, pulmonary arterial hypertension; 5-HT, 5-hydroxytryptamine (serotonin); BMPR2, bone morphogenetic protein receptor type 2; BW, body weight; COX, cyclooxygenase; E_{\max} , maximal drug effect; K_v , voltage-gated potassium channel; LV, left ventricle; PA, pulmonary artery; S, septum; SAP, systemic arterial pressure; RV, right ventricle; RVSP, right ventricular systolic pressure; SOD, superoxide dismutase; TXA₂, thromboxane A₂; NS-398, *N*-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methane sulfonamide; U46619, (Z)-7-[(1S,3S,4S)-3-[(E,3S)-3-hydroxyoct-1-enyl]-5-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]hept-5-enoic acid; L-NAME, *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester; SC236, 4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide; TP, thromboxane prostanoid; ROS, reactive oxygen species.

2000), and down-regulation of its expression is a common feature of several forms of PAH (Atkinson et al., 2002). Inactivation, down-regulation, or gene polymorphisms of voltage-gated potassium channels (K_v) have also been implicated in PAH (Yuan et al., 1998). Several lines of evidence also indicate that serotonin [5-hydroxytryptamine (5-HT)] plays a central role in the pathogenesis of this entity. Thus, 5-HT stimulates pulmonary artery (PA) contraction and smooth muscle cell proliferation and blocks K_v (MacLean et al., 2000; Cogolludo et al., 2006b). Hyper-responsiveness to 5-HT in large and small PAs is a common feature of PAH (Le Cras et al., 2000; Sato et al., 2000; Keegan et al., 2001; Thomas and Wanstall, 2003; Rodat et al., 2007). Elevated plasma levels of 5-HT and overexpression or polymorphisms in the genes encoding 5-HT receptors or the 5-HT transporter are associated with the disease (MacLean et al., 2000). It has also been suggested that local endothelium-derived 5-HT acting in a paracrine manner may be involved in PAH (Eddahibi et al., 2006). Furthermore, pharmacological inhibition or genetic deletion of 5-HT receptors or the 5-HT transporter attenuates PAH and prolongs survival (MacLean et al., 2000). Loss of nitric-oxide bioavailability is an additional component of the endothelial dysfunction and vascular pathology found in PAH (Coggins and Bloch, 2007).

In rats treated with streptozotocin, a widely used model of type 1 diabetes, we have found pulmonary endothelial dysfunction associated with increased superoxide production and up-regulation of the NADPH oxidase subunit p47^{phox} (Lopez-Lopez et al., 2008). Right ventricular hypertrophy has also been found in this model (Al-Shafei et al., 2002). We hypothesized that type 1 diabetes could lead to the development of PAH. Therefore, the present study was designed to analyze the effects of streptozotocin on pulmonary markers of PAH, including the pulmonary expression of key proteins of the disease, K_v currents, PA pressure, and right ventricular hypertrophy. We also further analyzed the mechanisms contributing to the vascular hyper-reactivity of PA to 5-HT.

Materials and Methods

Animals and Treatments. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication 85-23, revised 1996), and the procedures were approved by the institutional review board (Comité de Experimentación Animal, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain). Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control and diabetic groups. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 70 mg/kg streptozotocin (controls were injected with saline) and followed for 6 weeks (one group was followed for 4 months). In a further experimental series, streptozotocin-treated rats were randomly cotreated with insulin glargine (5 units/kg, once daily) or saline. Blood glucose was analyzed using a clinical glucometer.

Pressure Measurements. Systolic and diastolic systemic arterial pressures (SAPs) were analyzed with a pressure transducer via a catheter located in the right carotid artery in anesthetized (pentobarbitone, 30–50 mg/kg i.p.) rats ventilated with room air. Right ventricular systolic pressure (RVSP) was then measured in open-chest rats with a pressure transducer via a catheter advanced through the right jugular vein and placed into the right ventricle (RV).

Lung Histology. The right lung was inflated *in situ* with formol (via a column of 25-cm height through the trachea) and embedded in paraffin. Lung sections were stained by hematoxylin/eosin and Masson trichrome techniques and examined by light microscopy. Elastin was visualized by its green autofluorescence. Small arteries were

analyzed in a blinded fashion and categorized as muscular, partially muscular, or nonmuscular.

Vascular Reactivity. Intrapulmonary artery rings (2–3 mm long, internal diameter ~0.5–0.8 mm) were dissected and mounted in Krebs' solution under 0.75 g of resting tension in organ chambers as described previously (Cogolludo et al., 2006b). In some experiments, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface of the rings with a metal rod. The endothelium removal procedure was verified by the inability of acetylcholine (10^{-6} M) to relax arteries precontracted with 10^{-6} M phenylephrine. After equilibration, rings were precontracted by 80 mM KCl, and once a stable contraction was reached they were washed with Krebs' solution for 30 min, and concentration-response curves to 5-HT (10^{-8} to 10^{-4} M) were performed by cumulative addition in the absence or presence of drugs.

K_v Current Recordings. PA smooth muscle cells were enzymatically isolated, and membrane currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as described previously (Cogolludo et al., 2006b).

Western Blot Analysis. Pulmonary artery or whole lung homogenates were run by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and Western blot was performed as described previously (Moreno et al., 2004) using primary monoclonal mouse anti- α - or anti- β -actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-BMPR2 (BD Biosciences Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-5HT_{2A} (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), anti-cyclooxygenase-2 (COX-2) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), or anti- $K_v1.5$ (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) antibodies.

Statistical Analysis. Results are expressed as means \pm S.E.M. of measurements. Statistical analysis was performed by an unpaired Student's *t* test and for multiple comparisons by one-way analysis of variance followed by a Newman-Keuls test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Individual cumulative concentration-response curves were fitted to a logistic equation. The maximal drug effect (E_{max}) and the drug concentration producing 50% of the E_{max} (EC_{50}) expressed as negative log molar value (pD_2) were calculated from the fitted curves for each ring. Apparent pK_B values were calculated according to the equation $pK_B = \log(DR - 1) - \log[B]$, where DR is the ratio of the mean EC_{50} values of the agonist in the presence and absence of a given concentration ($[B]$) of the antagonist.

Results

Right Ventricular Systolic Pressure and Right Ventricular Weight. After 6 weeks of streptozotocin treatment, animals developed the expected increase in blood glucose (488 ± 39 mg/dl; $P < 0.01$ versus 134 ± 13 mg/dl in control animals) and decrease in body weight (BW) (196 ± 13 g; $P < 0.01$ versus 367 ± 10 g in control animals). We found no significant changes in RVSP or the ratios of the free wall of the RV to BW, free wall of the left ventricle (LV) plus septum (S) to BW or RV/(LV+S) compared with controls (Fig. 1A). Moreover, diabetes did not modify the percentage of muscular, partially muscular, or nonmuscular arteries (Fig. 1B). However, in the group treated for 4 months with streptozotocin (blood glucose 473 ± 31 mg/dl; $P < 0.01$ versus 125 ± 5 mg/dl in control animals) there was a significant increase in RVSP compared with parallel controls (22.4 ± 1.9 , $n = 6$ versus 16.7 ± 0.7 mm Hg, $n = 4$; $P < 0.05$).

Lung BMPR2 But Not $K_v1.5$ Expression Is Down-Regulated in Diabetes. Because BMPR2 and $K_v1.5$ are key proteins involved in PAH we examined its expression in diabetic lungs. Diabetes induced a clear down-regulation of lung BMPR2 expression (Fig. 2A). In contrast, the expression of $K_v1.5$ channel protein was not significantly modified in these diabetic animals (Fig. 2B). In isolated PA smooth mus-

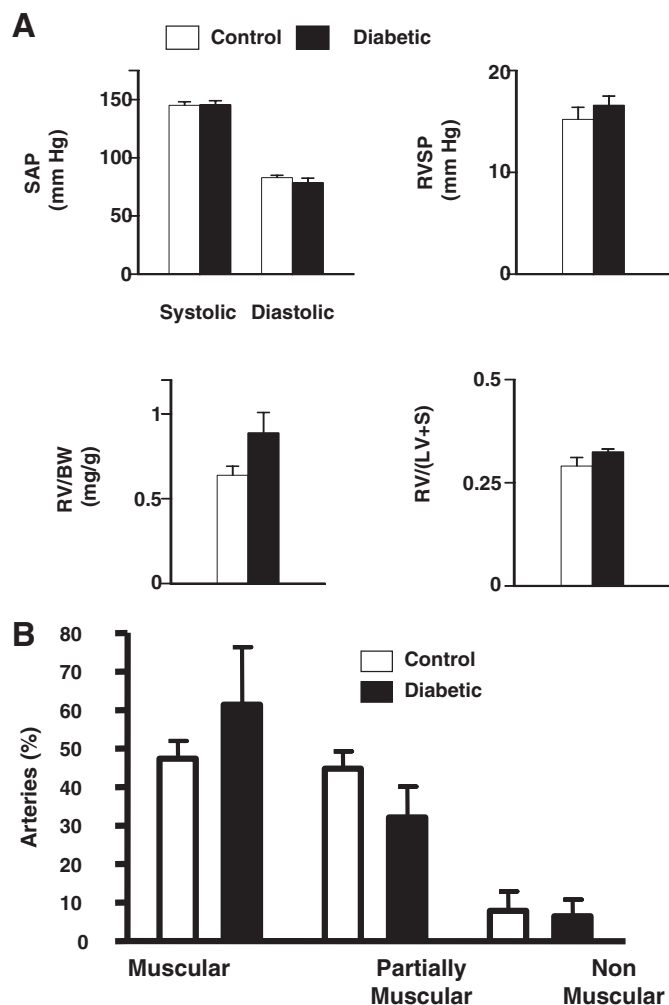


Fig. 1. Effects of diabetes on RVSP, right ventricular hypertrophy, and PA muscularization. A, systolic and diastolic SAP, RVSP, right ventricular weight relative to body weight (RV/BW), and right ventricular weight relative to left ventricular plus septum weight [RV/(LV+S)] in control (open columns) and streptozotocin-treated (solid columns) rats ($n = 5$ and 8 , respectively). B, percentage of muscular, partially muscular, and nonmuscular arteries in control and diabetic rats ($n = 4$). Each column represents the mean \pm S.E.M.

cle cells, membrane capacitance, an estimate of membrane surface, was similar in both groups (14 ± 2 and 14 ± 1 pF in control and diabetic, respectively; not significant). We also observed a nonsignificant decrease in the amplitude of the K_V currents in diabetic animals (Fig. 2C).

PA from Diabetic Rats Show Endothelium-Independent Hyper-Responsiveness to 5-HT. 5-HT induced a concentration-dependent contractile response that was higher in diabetic rats compared with control rats (Fig. 3A). The analysis of the concentration-response curve indicated that diabetes induced an increase in the maximal contractile response (E_{max} ; Fig. 3C) without significant changes in the concentration of 5-HT required for half-maximal contraction (pD_2 ; Fig. 3C). Because this increased response could be attributed to a reduced nitric-oxide bioavailability (Lopez-Lopez et al., 2008) similar experiments were carried out in the presence of the nitric-oxide synthase inhibitor L-NAME. This drug increased the maximal response to 5-HT in both diabetic and control animals ($P < 0.05$), but the difference between both groups remained highly significant ($P < 0.01$;

Fig. 3, B and C). Likewise, in endothelium-denuded arteries the response to 5-HT was higher ($P < 0.01$) than in intact ones, but again diabetic-denuded vessels were strongly hyper-responsive ($P < 0.01$; Figs. 3C and 4A). In endothelium-denuded arteries from rats cotreated with streptozotocin plus insulin (blood glucose = 178 ± 5 mg/dl) the E_{max} of 5-HT was reduced ($115 \pm 17\%$; $P < 0.05$) compared with the parallel group of streptozotocin-treated rats (glucose = 440 ± 26 ; $E_{max} = 201 \pm 17\%$).

Role of 5-HT_{2A} Receptors. We analyzed the contractile response of 5-HT in endothelium-intact and -denuded PA in the presence of the competitive antagonist of 5-HT_{2A} receptors, ketanserin. This drug produced a rightward shift of the concentration response to 5-HT (Fig. 4A). The calculated pK_B values of ketanserin from this shift, an indicator of the potency of the antagonist, were 8.2 in both intact and denuded arteries (Fig. 4B). These pK_B values are in agreement with the expected potency of the antagonist for 5-HT_{2A} receptors (8.1–9.7) (Alexander et al., 2008), indicating that these receptors seem to play a major role in 5-HT contraction as reported previously (MacLean et al., 1996). The potency of ketanserin was similar in control and diabetic animals in both intact and denuded vessels. To analyze the possible role of changes in 5-HT_{2A} receptors, its expression was analyzed in lung homogenates by Western blot. The expression of the 5-HT_{2A} receptors was increased ~ 2 -fold in diabetic rats (Fig. 4C).

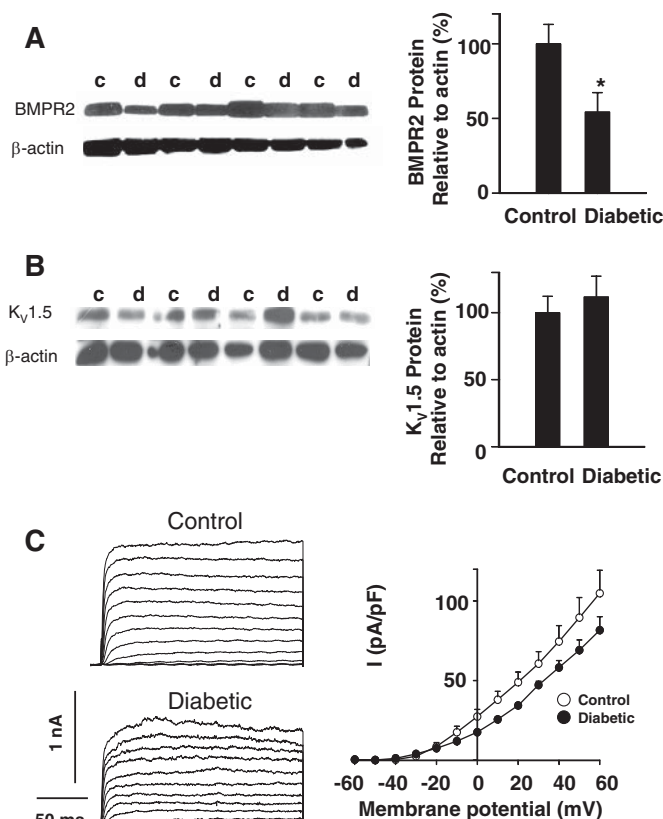


Fig. 2. Diabetes down-regulates BMPR2 but not Kv1.5 expression. A and B, expression of BMPR2 (A) and Kv1.5 (B) in lungs from diabetic (d) and parallel control (c) rats measured by Western blot. *, $P < 0.05$ versus control. C, K_V currents recorded in isolated PA smooth muscle cells. Left, current traces are shown for depolarization pulses from -60 to $+60$ mV from a holding potential of -60 mV. Right, current-voltage relationships measured at the end of the pulse ($n = 4$ – 8).

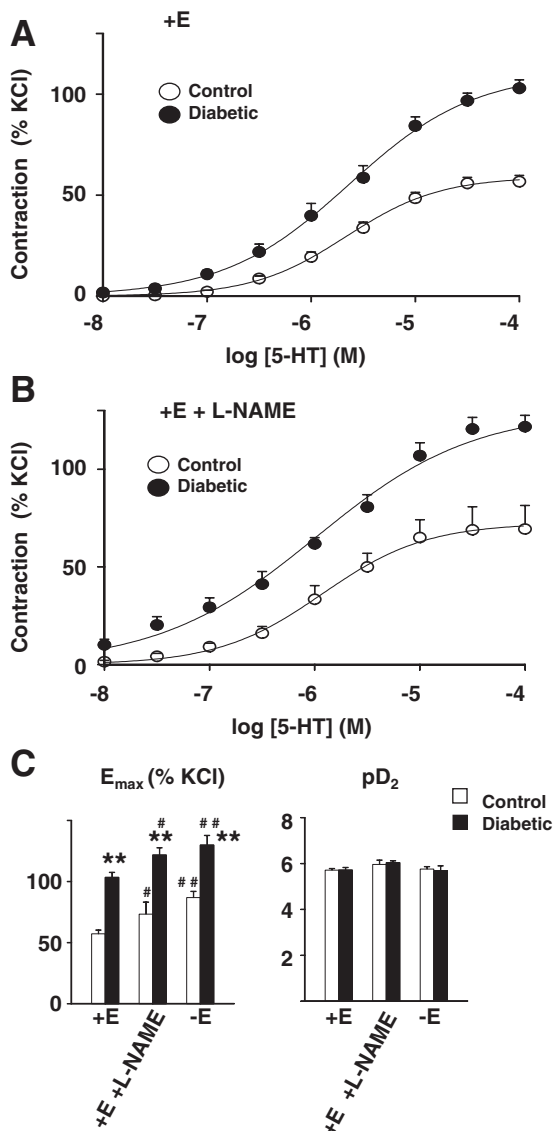


Fig. 3. PA from diabetic rats are hyper-responsive to 5-HT. A and B, vasoconstrictor responses induced by 5-HT in endothelium-intact (+E) PA from diabetic and control rats in the absence (A; $n = 17$ and 13 , respectively) or the presence (B; $n = 7$ and 5 , respectively) of L-NAME (10^{-4} M). C, E_{max} and pD_2 values calculated from data here and in endothelium-denuded PA (–E from Fig. 4A). **, $P < 0.01$ versus control. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$, versus +E.

Role of Cyclooxygenase-2. To analyze a possible role of COX, we tested the effects of the nonselective COX inhibitor indomethacin in endothelium-intact vessels. This drug produced a weak rightward shift of the curve to 5-HT in PA from control rats (Fig. 5A), leading to a significant decrease in the pD_2 value (Fig. 5C). It is noteworthy that indomethacin abolished the hyper-responsiveness to 5-HT in diabetic rats. In the presence of the selective COX-2 inhibitor *N*-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methane sulfonamide (NS-398) the responses to 5-HT in control rats were similar to those in its absence. However, in diabetic rats, this drug prevented the enhanced response to 5-HT and also induced a weak rightward shift of the curve (Fig. 5B), leading to a significant decrease in the pD_2 value (Fig. 5C). Consistent with a role for COX-2 in the vascular responses, the amount of this protein was strongly increased in PA from diabetic rats (Fig. 5D).

Role of Superoxide. Because we have reported previously an increase in NADPH oxidase-derived superoxide in PA from diabetic rats (Lopez-Lopez et al., 2008), we analyzed the contractile response to 5-HT in endothelium-intact PA treated with superoxide dismutase (SOD) or the NADPH oxidase inhibitor apocynin. The contraction induced by 5-HT in control rats (Fig. 6) was similar to that observed in the absence of the drugs (Fig. 3A). However, both treatments prevented enhanced response to 5-HT in diabetic rats.

Effects of Exogenous Addition of Superoxide and a Thromboxane A_2 Analog. The responses to 5-HT in PA from control rats were analyzed in the presence of the superoxide-generating drug pyrogallol or the thromboxane A_2 (TXA $_2$) analog (*Z*)-7-[(1*S*,3*S*,4*S*)-3-[(*E*,3*S*)-3-hydroxyoct-1-enyl]-5-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]hept-5-enoic acid (U46619). After washing the initial response to KCl, pyrogallol or U46619 was added at concentrations titrated to produce 5 to 15% of the response to KCl (3×10^{-6} and 10^{-8} M, respectively). After 15 min the concentration-response to 5-HT was performed. Pyrogallol increased the E_{max} to 5-HT without changing the pD_2 value, and this effect was prevented by indomethacin (Fig. 7A), mimicking the results in diabetic rats. On the other hand, U46619 produced a leftward shift of the curve to 5-HT (increase in pD_2) with a nonsignificant increase in the E_{max} , and this effect was not prevented by apocynin (Fig. 7B).

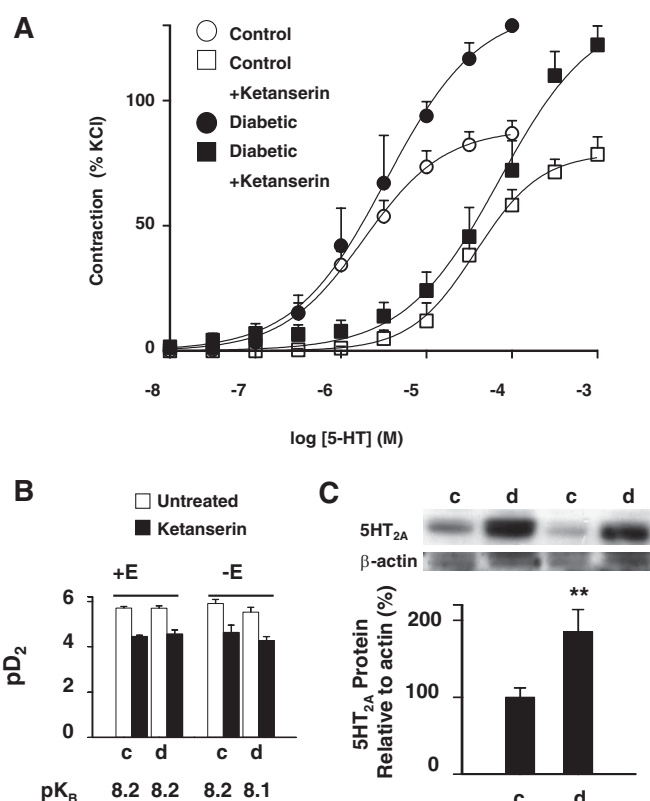


Fig. 4. Role of 5-HT $_{2A}$ receptors. A, effects of the 5-HT $_{2A}$ receptor antagonist ketanserin (10^{-7} M) on the vasoconstrictor responses to 5-HT in endothelium-denuded PA ($n = 5-7$). B, calculated pD_2 and pK_B values for both endothelium-intact (+E) and endothelium-denuded (–E) PA. C, expression of 5-HT $_{2A}$ receptors in lungs from diabetic rats (d; $n = 8$) and parallel controls (c; $n = 8$). **, $P < 0.01$ versus control.

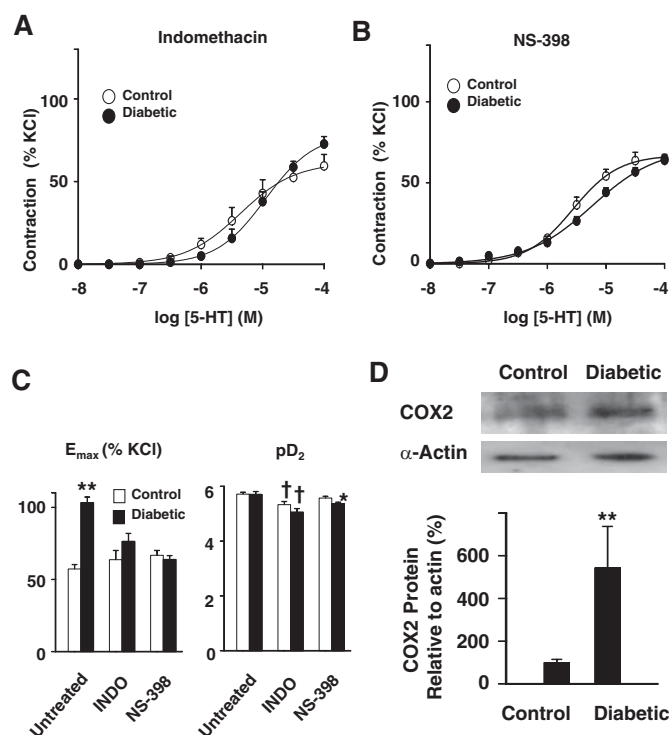


Fig. 5. Role of COX-2. A and B, effects of the nonselective COX inhibitor indomethacin (INDO; 10^{-5} M) (A) and the COX-2-selective inhibitor NS-398 (10^{-5} M) (B) on the vasoconstrictor responses to 5-HT in endothelium-intact PA ($n = 6$). C, E_{max} and pD_2 values calculated from A and B and in the absence of drug (untreated, calculated from Fig. 3). D, expression of COX-2 in PA from control ($n = 5$) and diabetic ($n = 6$) rats. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, diabetic versus control rats. †, $P < 0.05$, indomethacin versus untreated.

Discussion

Despite the well known link between diabetes and systemic cardiovascular disease, the relationship with pulmonary vascular disease has been largely overlooked. In a previous study, insulin resistance in ApoE(−/−) mice was associated with PAH (Hansmann et al., 2007). We found previously PA endothelial dysfunction, a characteristic feature of PAH, in rats with type 1 diabetes, and right ventricular hypertrophy was also reported in streptozotocin-treated rats (Al-Shafei et al., 2002; Lopez-Lopez et al., 2008). Herein, we show that rats treated with streptozotocin share a number of pulmonary vascular abnormalities with animal models and patients with PAH such as down-regulation of BMPR2, COX-2 induction, up-regulation of 5-HT_{2A} receptors, and vascular hyper-responsiveness to 5-HT in addition to those described previously such as endothelial dysfunction and pulmonary vascular oxidative stress. RVSP and RV/(LV+S) and PA muscularization were not significantly different in diabetic rats compared with nondiabetic controls at 6 weeks, whereas at 4 months we found a significant increase in RVSP. This increase was modest, much lower than classic models of PAH.

Both clinical and experimental forms of PAH are associated with a decrease in K_V currents and diminished pulmonary expression of BMPR2 (Atkinson et al., 2002; Takahashi et al., 2006; Morty et al., 2007) and $K_V1.5$, $K_V3.1$, and $K_V2.1$ channels (Yuan et al., 1998; Bonnet et al., 2006; Guignabert et al., 2006). In diabetic animals lung BMPR2 protein was

down-regulated and it has been also reported in diabetic rat kidneys (Wang et al., 2001). Our data are consistent with the concept that BMPR2 mutation or down-regulation is a predisposing factor but may not be sufficient for PAH 5-HT (Long et al., 2006). In contrast, in diabetic rats there was no significant change in K_V currents and $K_V1.5$ expression. This is consistent with the small, if any, change in both parameters found in the fawn hooded rats, an animal model of genetic predisposition to PAH, at 20 weeks of age (prehypertensive) (Bonnet et al., 2006).

Hyper-responsiveness to 5-HT in large and small PA rings is a common feature of animal models of PAH, including cardiopulmonary bypass-, chronic hypoxia-, intermittent hypoxia-, or monocrotaline-induced PAH (Brown et al., 1998; Sato et al., 2000; Keegan et al., 2001; Thomas and Wanstall, 2003; Rodat et al., 2007). We also found a marked increase in the response to 5-HT in intrapulmonary arteries from diabetic rats. Because PAs from BMPR2(+/-) mice also exhibit increased contractile responses to 5-HT (Long et al., 2006) it seems likely that in the diabetic rats hyper-responsiveness to 5-HT is a consequence of the BMPR2 down-regulation. It is noteworthy that PAH is not evident in BMPR2(+/-) mice but it does develop after chronic 5-HT infusion, an effect that is exaggerated under hypoxic conditions (Long et al., 2006).

The increased response to 5-HT was maintained in endothelium-denuded vessels or in the presence of L-NAME, in-

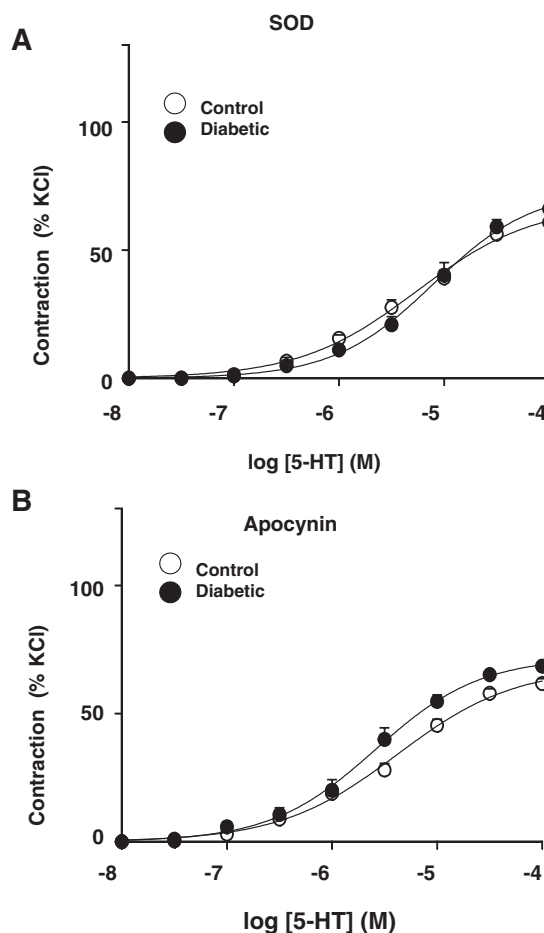


Fig. 6. Role of superoxide. Effects of the superoxide scavenger SOD (100 U/ml) (A) and the NADPH oxidase inhibitor apocynin (3×10^{-4} M) (B) on the vasoconstrictor responses to 5-HT in endothelium-intact PA ($n = 6$).

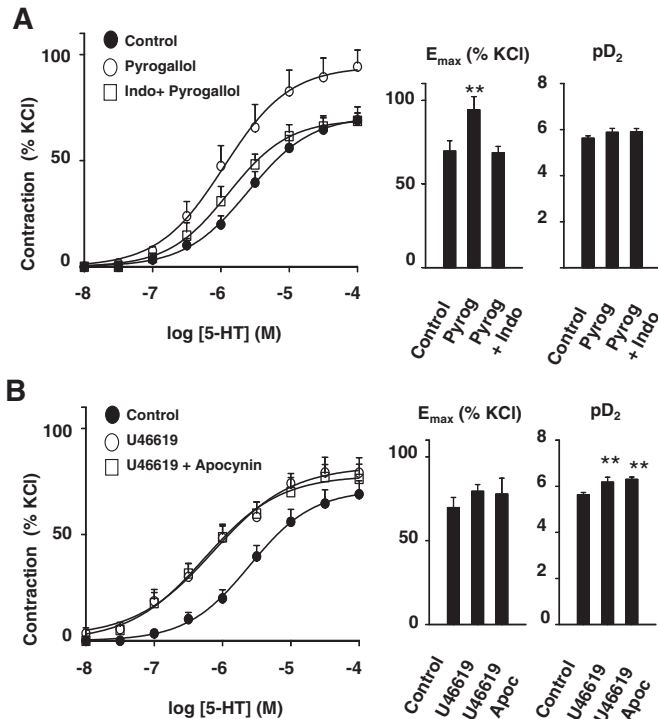


Fig. 7. Superoxide and a TXA₂ analog enhance 5-HT contractile responses in PA from control rats. Effects of the nonenzymatic generator of superoxide pyrogallol (pyrog; 3×10^{-6} M) in the absence or presence of indomethacin (indo; 10^{-5} M) (A) and the TXA₂ analog U46619 (10^{-8} M) (B) in the absence or presence of apocynin (apoc; 3×10^{-4} M) on the vasoconstrictor responses to 5-HT in PA ($n = 4-8$). **, $P < 0.01$ versus control.

dicating that a major component of this phenomenon is not related to acute release of endothelial vasoactive factors. However, differences tended to be smaller in endothelium-denuded compared with intact vessels, suggesting that endothelial dysfunction (Al-Shafei et al., 2002; Lopez-Lopez et al., 2008) might also play a role. Moreover, it seems to be secondary to the high blood glucose rather than a direct effect of streptozotocin because it was reduced by cotreatment with insulin. On the other hand, the similar potency of ketanserin, a specific 5HT_{2A} receptor competitive antagonist, on 5-HT contraction indicates that the responses to 5-HT are mediated mainly by 5HT_{2A} receptors in both control and diabetic animals. However, a possible additional role for other receptors such as 5-HT_{1B} cannot be ruled out (MacLean et al., 2000). The overexpression of 5HT_{2A} receptors in diabetic animals could be responsible for the higher contractile response of 5-HT. Nevertheless, this possibility does not explain the acute reversal by COX inhibitors or reactive oxygen species (ROS) scavengers as discussed below.

COX-2 protein levels are increased in lungs from rats with PAH induced by hypoxia (Chida and Voelkel, 1996) or high pulmonary blood flow (Sato et al., 2000; Lam et al., 2005) and in hypoxic human PA smooth muscle cells (Yang et al., 2002). In addition, elevated TXA₂ levels have been demonstrated in several forms of PAH (Christman et al., 1992). Accordingly, we found increased COX-2 expression in the PA from diabetic rats. Moreover, streptozotocin-induced diabetes led to an exaggerated lung production of prostaglandin E₂, prostaglandin F_{2α}, and prostaglandin D₂ from exogenous arachidonic acid (Watts et al., 1982). However, whether COX-2 is bene-

ficial or detrimental in PAH is controversial. Thus, inhibition of COX-2 by celecoxib exhibited beneficial effects against the development of monocrotaline-induced PAH (Rakotoniaina et al., 2008). In contrast, hypoxia-induced PAH was exacerbated by the celecoxib derivative 4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide (SC236) (Pidgeon et al., 2004) and in COX-2 knockout animals (Cathcart et al., 2008; Fredenburgh et al., 2008). Herein, we found that acute inhibition of COX-2 can prevent the hypercontractile response to 5-HT in diabetic rats as previously found in PAH induced by intermittent hypoxia (Thomas and Wanstall, 2003) or high pulmonary blood flow (Sato et al., 2000). These results suggest that a COX-2-derived metabolite is responsible for the enhanced maximal response to 5-HT. The fact that the TP receptor agonist U46619 reproduces at least partially the effect of diabetes suggests that the COX-2 metabolite might be acting on these receptors. Likewise, COX-2-dependent and endothelium-independent vascular hyper-responsiveness have also been reported in several systemic arteries from animal models of type 1 and type 2 diabetes (Jarajapu et al., 2008; Shi and Vanhoutte, 2008). Moreover, COX-2 inhibitors and ROS scavengers prevent the vascular hyper-responsiveness in endothelium-denuded femoral arteries from streptozotocin-induced diabetic rats (Shi and Vanhoutte, 2008), suggesting that COX metabolites and ROS are generated in the smooth muscle. In addition, the TP receptor antagonist terutroban prevented the femoral vascular hyper-responsiveness to ROS in diabetic animals, suggesting that the COX metabolite is acting via TP receptors (Shi and Vanhoutte, 2008).

Type 1 and type 2 diabetes are associated with systemic oxidative stress (Keaney and Loscalzo, 1999; Meigs et al., 2007). In PA, diabetes induces an increase in superoxide and up-regulation of p47^{phox}, the regulatory subunit of the superoxide-generating enzyme NADPH oxidase, which is involved in endothelial dysfunction (Lopez-Lopez et al., 2008). The down-regulation of BMPR2 in diabetic rat kidney was prevented by the antioxidant tiron (Yeh et al., 2009), suggesting that it was secondary to oxidative stress. In addition, oxidative stress is involved in the exaggerated response to vasoconstrictors in systemic arteries from diabetic animals (Shi and Vanhoutte, 2008). Thus, we hypothesized that scavenging superoxide using SOD or inhibiting its main source using apocynin, a widely used yet nonselective NADPH oxidase inhibitor, might also prevent 5-HT hyper-responsiveness. In fact, both approaches prevented the exaggerated response to 5-HT in diabetic PA without affecting the controls. On the contrary, exogenous addition of a superoxide-donating drug such as pyrogallol increased the maximal response to 5-HT in control PA, mimicking the effects of diabetes.

The relationship of COX-2 and reactive oxygen species is complex because COX-2 can generate superoxide directly or indirectly via the release of TXA₂ (Cogolludo et al., 2006a; Shi and Vanhoutte, 2008) and conversely, COX-2 activity can be stimulated by reactive oxygen species (Garcia-Redondo et al., 2009). Thus, we questioned what was first in the signaling pathway in diabetic PA COX-2 activity or increased oxidative stress. Our data fit better with the second possibility because indomethacin prevented the pyrogallol-induced hyper-responsiveness to 5-HT in control rats, whereas apocynin had no effect on U46619-induced sensitization. Taken together, the present results suggest that NADPH oxidase-

derived reactive oxygen species activate its downstream effector COX-2, leading to the enhanced response to 5-HT. This is further supported by the up-regulation of the main proteins involved in this pathway, p47^{phox}, COX-2, and 5-HT_{2A} receptors observed in the diabetic lungs.

In conclusion, consistent with data in humans and animal models of PAH, in diabetic rats BMPR2 expression was down-regulated, 5-HT_{2A} receptors, p47^{phox} and COX-2 were up-regulated, and PAs were hyper-responsive to 5-HT. This latter effect was independent of the endothelium and seemed to be related to NADPH oxidase-induced superoxide production and COX-2-derived metabolites. All of these changes were not sufficient to induce a consistent increase in PA pressure or PA muscularization. However, a prolonged period of diabetes induced an increase in RVSP. Our results further strengthen the link between diabetes and PAH.

Acknowledgments

We thank Enrique Moreno and Bianca Barreira for excellent technical assistance.

Authorship Contributions

Participated in research design: Moreno, Lorente, Cogolludo, and Perez-Vizcaino.

Conducted experiments: Lopez-Lopez, Moral-Sanz, Frazziano, Gomez-Villalobos, Moreno, Menendez, and Flores-Hernandez.

Performed data analysis: Lopez-Lopez, Moral-Sanz, Frazziano, Gomez-Villalobos, Moreno, Menendez, Flores-Hernandez, Lorente, Cogolludo, and Perez-Vizcaino.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Perez-Vizcaino.

References

- Alexander SP, Mathie A, and Peters JA (2008) Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* **153** (Suppl 2):S1–S209.
- Al-Shafei AI, Wise RG, Gresham GA, Bronns G, Carpenter TA, Hall LD, and Huang CL (2002) Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *J Physiol* **538**:541–553.
- Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, and Morrell NW (2002) Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* **105**:1672–1678.
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, et al. (2006) An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**:2630–2641.
- Brown L, Miller J, Dagger A, and Sernia C (1998) Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**: 108–115.
- Cathcart MC, Tamosiuniene R, Chen G, Neilan TG, Bradford A, O'Byrne KJ, Fitzgerald DJ, and Pidgeon GP (2008) Cyclooxygenase-2-linked attenuation of hypoxia-induced pulmonary hypertension and intravascular thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:51–58.
- Coggins MP and Bloch KD (2007) Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1877–1885.
- Cogolludo A, Frazziano G, Coboño L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, Tamargo J, and Perez-Vizcaino F (2006a) Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann NY Acad Sci* **1091**:41–51.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Coboño L, Tamargo J, and Perez-Vizcaino F (2006b) Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* **98**:931–938.
- Chan SY and Loscalzo J (2008) Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol* **44**:14–30.
- Chida M and Voelkel NF (1996) Effects of acute and chronic hypoxia on rat lung cyclooxygenase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **270**:L872–L878.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, and Loyd JE (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **327**:70–75.
- Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, et al. (2006) Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* **113**:1857–1864.
- Fouty B (2008) Diabetes and the pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**:L725–L726.
- Fredenburgh LE, Liang OD, Macias AA, Polte TR, Liu X, Riascos DF, Chung SW, Schissel SL, Ingber DE, Mitsialis SA, et al. (2008) Absence of cyclooxygenase-2 exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances contractility of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **117**:2114–2122.
- García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, and Salasces M (2009) Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther* **328**:19–27.
- Guignabert C, Izikki M, Tu LI, Li Z, Zadigue P, Barlier-Mur AM, Hanoun N, Rodman D, Hamon M, Adnot S, et al. (2006) Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res* **98**:1323–1330.
- Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, and Rabinovitch M (2007) Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Circulation* **115**:1275–1284.
- Hernández-Díaz S, Van Marter LJ, Werler MM, Louik C, and Mitchell AA (2007) Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* **120**:e272–282.
- International PH Consortium, Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, Thomson JR, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC, and Trembath RC (2000) Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* **26**:81–84.
- Jarajapu YP, Guberski DL, Grant MB, and Knot HJ (2008) Myogenic tone and reactivity of cerebral arteries in type II diabetic BBZDR/Wor rat. *Eur J Pharmacol* **579**:298–307.
- Keaney JF Jr. and Loscalzo J (1999) Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. *Circulation* **99**:189–191.
- Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, and MacLean MR (2001) Contribution of the 5-HT_{1B} receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT_{1B}-receptor knockout mice and the 5-HT_{1B/1D}-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* **89**:1231–1239.
- Lam CF, Peterson TE, Croatt AJ, Nath KA, and Katusic ZS (2005) Functional adaptation and remodeling of pulmonary artery in flow-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**:H2334–H2341.
- Le Cras TD, Kim DH, Markham NE, and Abman AS (2000) Early abnormalities of pulmonary vascular development in the Fawn-Hooded rat raised at Denver's altitude. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L283–L291.
- Long L, MacLean MR, Jeffery TK, Morecroft I, Yang X, Rudarakanchana N, Southwood M, James V, Trembath RC, and Morrell NW (2006) Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res* **98**: 818–827.
- Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A, and Perez-Vizcaino F (2008) Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**:L727–L732.
- MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, and Adnot S (2000) 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol* **131**:161–168.
- MacLean MR, Sweeney G, Baird M, McCulloch KM, Houslay M, and Morecroft I (1996) 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **119**:917–930.
- Makarevich AE, Valevich VE, and Pochtavtsev AU (2007) Evaluation of pulmonary hypertension in COPD patients with diabetes. *Adv Med Sci* **52**:265–272.
- Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keaney JF Jr, Vasan RS, and Benjamin EJ (2007) Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* **30**:2529–2535.
- Moreno L, Losada B, Cogolludo A, Lodi F, Lugnier C, Villamor E, Moro M, Tamargo J, and Pérez-Vizcaino F (2004) Postnatal maturation of phosphodiesterase 5 (PDE5) in piglet pulmonary arteries: activity, expression, effects of PDE5 inhibitors, and role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Pediatr Res* **56**:563–570.
- Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, Hecker M, Zakrzewicz A, Kouri FM, Peters DM, Dumitrascu R, Seeger W, Knaus P, et al. (2007) Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1072–1078.
- Movahed MR, Hashemzadeh M, and Jamal MM (2005) The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type II diabetes mellitus. *Chest* **128**:3568–3571.
- Pidgeon GP, Tamosiuniene R, Chen G, Leonard I, Belton O, Bradford A, and Fitzgerald DJ (2004) Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: regulation by cyclooxygenase-2. *Circulation* **110**:2701–2707.
- Rabinovitch M (2008) Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* **118**:2372–2379.
- Rakotoniaina Z, Guerard P, Lirussi F, Rochette L, Dumas M, Goirand F, and Bardou M (2008) Celecoxib but not the combination of celecoxib+atorvastatin prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat. *Nauyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **378**:241–251.
- Rodat L, Savineau JP, Marthan R, and Guibert C (2007) Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflügers Arch* **454**:41–51.
- Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB Sr, and Wilson PW (2005) Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes* **54**:3252–3257.
- Sato K, Li J, Metais C, Bianchi C, and Sellke F (2000) Increased pulmonary vascular contraction to serotonin after cardiopulmonary bypass: role of cyclooxygenase. *J Surg Res* **90**:138–143.
- Shi Y and Vanhoutte PM (2008) Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol* **154**:639–651.

- Takahashi H, Goto N, Kojima Y, Tsuda Y, Morio Y, Muramatsu M, and Fukuchi Y (2006) Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L450–L458.
- Thomas BJ and Wanstall JC (2003) Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. *Eur J Pharmacol* **477**:153–161.
- Wang SN, Lapage J, and Hirschberg R (2001) Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **12**:2392–2399.
- Watts IS, Zakrzewski JT, and Bakhle YS (1982) Altered prostaglandin synthesis in isolated lungs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Thromb Res* **28**:333–342.
- Yang X, Sheares KK, Davie N, Upton PD, Taylor GW, Horsley J, Wharton J, and Morrell NW (2002) Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**:688–696.
- Yeh CH, Chang CK, Cheng MF, Lin HJ, and Cheng JT (2009) Decrease of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and its type II receptor (BMP-RII) in kidney of type 1-like diabetic rats. *Horm Metab Res* **41**:605–611.
- Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB, and Rubin LJ (1998) Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* **98**:1400–1406.
- Zamanian RT, Hansmann G, Snook S, Lilienfeld D, Rappaport KM, Reaven GM, Rabinovitch M, and Doyle RL (2009) Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **33**:318–324.

Address correspondence to: F. Perez-Vizcaino, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: fperez@med.ucm.es

RESEARCH**Open Access**

Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats

Javier Moral-Sanz, Carmen Menendez, Laura Moreno, Enrique Moreno, Angel Cogolludo and Francisco Perez-Vizcaino*

Abstract

Background: Insulin resistance and obesity are strongly associated with systemic cardiovascular diseases. Recent reports have also suggested a link between insulin resistance with pulmonary arterial hypertension. The aim of this study was to analyze pulmonary vascular function in the insulin resistant obese Zucker rat.

Methods: Large and small pulmonary arteries from obese Zucker rat and their lean counterparts were mounted for isometric tension recording. mRNA and protein expression was measured by RT-PCR or Western blot, respectively. K_V currents were recorded in isolated pulmonary artery smooth muscle cells using the patch clamp technique.

Results: Right ventricular wall thickness was similar in obese and lean Zucker rats. Lung BMPR2, $K_V1.5$ and 5-HT_{2A} receptor mRNA and protein expression and K_V current density were also similar in the two rat strains. In conductance and resistance pulmonary arteries, the similar relaxant responses to acetylcholine and nitroprusside and unchanged lung eNOS expression revealed a preserved endothelial function. However, in resistance (but not in conductance) pulmonary arteries from obese rats a reduced response to several vasoconstrictor agents (hypoxia, phenylephrine and 5-HT) was observed. The hyporesponsiveness to vasoconstrictors was reversed by L-NAME and prevented by the iNOS inhibitor 1400W.

Conclusions: In contrast to rat models of type 1 diabetes or other mice models of insulin resistance, the obese Zucker rats did not show any of the characteristic features of pulmonary hypertension but rather a reduced vasoconstrictor response which could be prevented by inhibition of iNOS.

Background

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease of poor prognosis characterized by vasoconstriction of pulmonary arteries (PA) and proliferation of pulmonary vascular endothelial and smooth muscle cells leading to increase vascular resistance and right heart failure with right ventricular hypertrophy as a hallmark [1,2]. These pathological events are influenced by genetic predisposition as well as environmental stimuli [1,3]. Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 (BMPR2) gene mutations have been described in some PAH patients [4] and diminished expression of its encoded protein has also been shown in both human and animal models of PAH [5-8]. Additionally, endothelial dysfunction and increased 5-HT contractile response have been

reported in PAH [9-11]. Several studies have reported the involvement of K_V channels in controlling membrane potential of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) and PA tone [12]. Moreover, it was reported the role of $K_V1.5$ in the development of PAH as a result of mutation or downregulation of the channel [13,14].

Obesity and insulin resistance have a worldwide increasing prevalence. Despite the fact that insulin resistance is strongly associated with systemic cardiovascular diseases [15,16] the relationship with pulmonary vascular disease has been almost disregarded [17]. Recent reports have suggested that insulin resistance might also be associated with pulmonary hypertension in humans [18-20] and in the ApoE deficient mice [21]. In rats with type 1 diabetes, we have recently found pulmonary endothelial dysfunction associated to increased superoxide production and upregulation of the NADPH oxidase subunit p47^{phox} [8]. The Obese Zucker rat is a well establish model of obesity and insulin resistance

* Correspondence: fperez@med.ucm.es
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. Spain and Ciber Enfermedades Respiratorias, CIBERES

associated to systemic vascular dysfunction [22-24]. Nonetheless, the pulmonary vasculature remains uncharacterized in this model. Therefore, the present study was designed to analyze the pulmonary markers of PAH including the pulmonary expression of key proteins of the disease, K_V currents, vascular reactivity of PA, and right ventricular hypertrophy in obese Zucker rats compared to their lean Zucker littermates.

Methods

Ethics statement

The present investigation conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication No. 85-23, revised 1996), and the procedures were approved by our institutional review board (Comité de Experimentación Animal, Universidad Complutense, 070208).

Animals, tissues and reagents

On the day of the experiment, male obese Zucker rats (fa/fa) and their littermates, lean Zucker rats (fa/-) (17-18 weeks old) were weighed and sacrificed by cervical dislocation and exsanguination. Pulmonary arteries (PA) were dissected to obtain conductance and resistance intrapulmonary arteries. Smooth muscle cells were then enzymatically isolated from resistance intrapulmonary arteries [25]. Blood glucose was measured using a clinical glucometer (OneTouch Ultra) and insulin using an enzyme immunoassay. Hearts were excised, fixed with formol embedded in paraffin and cut into 1 mm cross sections, visualized in a microscope, photographed and analyzed using imageJ (Ver 1.41, NIH, USA). All drugs were from Sigma (Tres Cantos, Spain).

Vascular reactivity

Resistance (diameter ~0.3-0.5 mm and length ~2 mm) and conductance (diameter ~1-1.2 mm and length ~3 mm) PA rings were mounted in Krebs solution at 37°C gassed with a 95% O₂-5% CO₂ mixture in a wire myograph or in organ chambers respectively. After stretching to give an appropriate resting tension (equivalent to 30 mm Hg as previously described [25] for resistance or 0.7 g for conductance arteries) each vessel was exposed to different vasoconstrictor agents to test the vascular response. The contractile responses were performed by cumulative addition and expressed as a percentage of the response to 80 mM KCl. The endothelial function was estimated by the analysis of the relaxant response to cumulative addition of acetylcholine (ACh, 10⁻⁹-10⁻⁴M) after precontraction with 10⁻⁷M phenylephrine in conductance arteries or with a concentration of phenylephrine titrated to induce a contraction 75% of the response to KCl. Some experiments were carried out in the presence of the NOS inhibitor L-NAME. Hypoxia

was induced by bubbling the Krebs solution with 95% N₂-5% CO₂ to achieve an oxygen concentration of 3-4% (24 ± 1 Torr) in the chamber as described [26].

Electrophysiological studies

Membrane currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch clamp technique with an Axopatch 200B and a analog to digital converter Digi-data 1322A (Axon Instruments, Burlingame, CA, U.S.A.). pClamp version 9 software was used for data acquisition and analysis. Cells were superfused with an external Ca²⁺-free Hepes solution (2 ml/min) and a Ca²⁺-free pipette (internal) solution containing (mmol/L): KCl 110, MgCl₂ 1.2, Na₂ATP 5, HEPES 10, EGTA 10, pH adjusted to 7.3 with KOH. Patch pipettes (2-4 MΩ) were constructed from borosilicate glass capillaries (GD-1, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan) using a programmable horizontal puller. Currents were evoked following the application of 200 ms depolarizing pulses from -60 mV to test potentials from -60 mV to +60 mV in 10 mV increments [27]. Hypoxia was induced by bubbling the solution with N₂ as described [26].

Protein expression

Whole lungs were homogenated under reducing conditions in the presence of DTT, proteases and phosphatases inhibitors. Protein content was determined by Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and equal amounts of proteins were loaded and subjected to electrophoresis on a SDS-PAGE (7.5-10%) followed by a transference to a PVDF membrane (Bio-Rad). Protein expression was quantified using primary antibodies anti-K_V1.5 (Alomone, Israel, 1:200 dilution), anti-5HT_{2A} (BD Biosciencias, 1:250 dilution), anti-Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 (BMPR2) (BD Biosciencias, 1:250 dilution), anti-eNOS (BD Biosciencias, 1:2500 dilution), anti-iNOS (Santa Cruz, CA, USA, 1:500 dilution), anti-β-actin (Sigma-Aldrich, Spain, 1:5000 dilution) and horseradish peroxidase conjugated secondary goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Santa Cruz Biotech, CA, USA, 1:10000 dilution). Proteins were detected using ECL-Plus Western blotting reagents (Amersham, GE Healthcare, CT, USA) and analyzed using Quantity One (BioRad).

Real time RT-PCR

Total RNA was isolated and purified from resistance PA homogenates using RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and converted into cDNA using iScript cDNA synthesis kit (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Real-time PCR was performed using a Taqman system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in the Genomic Unit of Universidad Complutense de Madrid. Specific primers were designed for rat K_V1.5 (sense 5'-

GGAAGAACAAGGCAACCAGA-3', antisense 5'-AGCTGACCTTCCGTTGACC-3'), iNOS (sense 5'-TTG GAGTTCACCCAGTTGTG-3', antisense 5'-ACATC-GAAGCGGCCATAG-3'), eNOS (sense 5'-GGTATTT-GATGCTCGGGACT-3', antisense 5'-TGTGGTTACA GATGTAGGTGAACA-3'), BMPR2 (sense 5'-CGGGC AGGATAAATCAGGA-3', antisense 5'-CAGGAAAG-TAAATTCGGGTGA-3') and β -actin (sense 5'-GCCC TAGACTTCGAGCAAGA-3', antisense 5'-TCAGG-CAGCTCATAGCTCTTC-3'). Data were normalized by the expression of β -actin.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm s.e.m. Data for Western blots and RT-PCR were normalized by the expression of β -actin and expressed as a percentage of the values obtained in the lean rats. Individual cumulative concentration-response curves were fitted to a logistic equation. The negative logarithm of the molar concentration that causes 50% of the maximum response (pD_2) and the maximum response (E_{max}) were calculated for each ring. Statistical analysis was performed by comparing the lean and obese Zucker groups with an unpaired Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Obese Zucker rats showed a final body weight $\sim 30\%$ higher than their lean littermates (476 ± 29 vs 364 ± 22 g, respectively, $P < 0.01$, $n = 20$ for both groups). Non fasting blood glucose was not significantly different (128 ± 13 vs 106 ± 5 mg/dL, respectively, $n = 13$ and 12) but insulin was strongly elevated (3.5 ± 0.2 vs 1.4 ± 0.2 ng/ml, respectively, $n = 7$ for both groups).

Heart wall thickness and BMPR2 expression

No significant changes were found in the wall thickness of the right ventricle (RV), the left ventricle (LV) or the septum (S) from obese as compared with lean rats (Figure 1A). The RT-PCR analysis revealed no changes in mRNA transcription levels of BMPR2 gene in resistance PA (Figure 1B) and Western blots showed no significant changes in the whole lung protein expression of BMPR2 or in its heavier precursor (pro-BMPR2) (Figure 1C).

K_V currents and $K_{V1.5}$ lung expression

Similar cell capacitance (17.8 ± 1.1 and 18.4 ± 0.7 pF in obese and lean rats, respectively), as a measure of the cell size, and similar K_V current density (Figure 2A) were found in lean and obese PASM. Moreover,

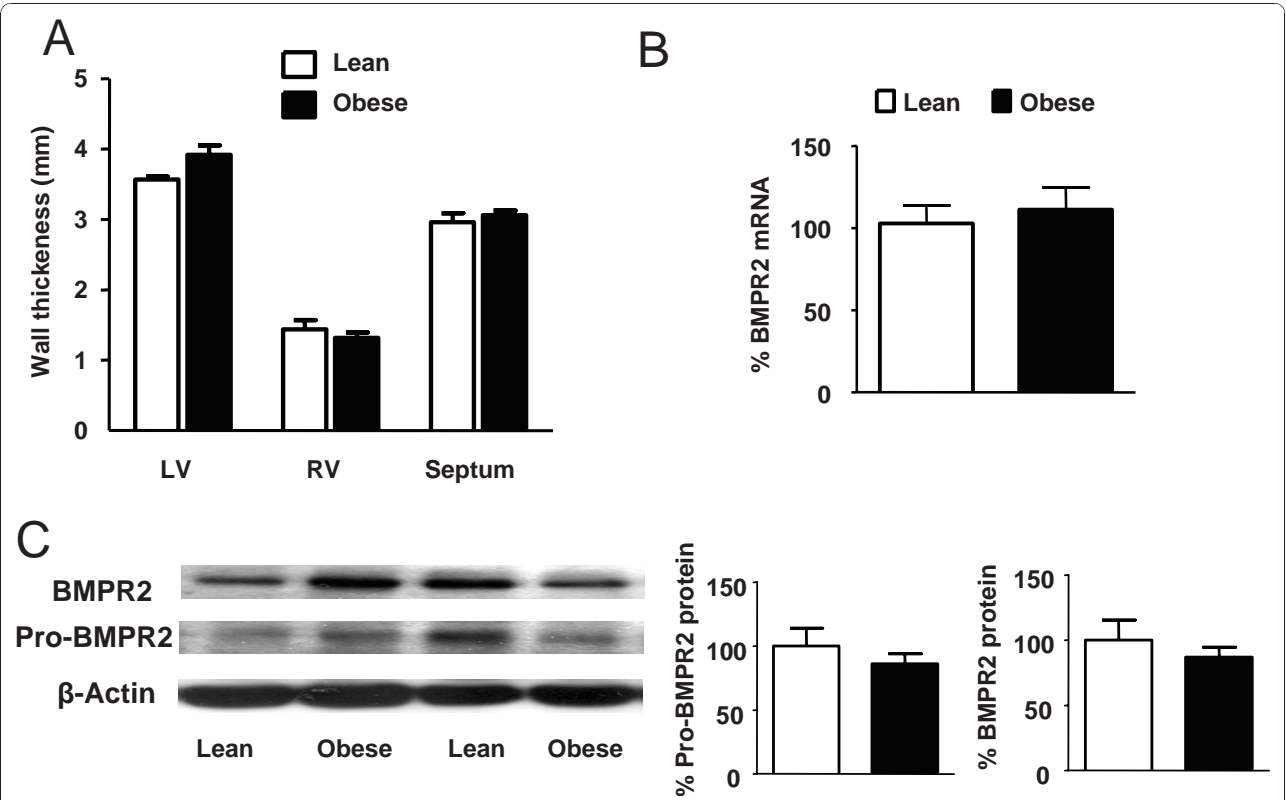


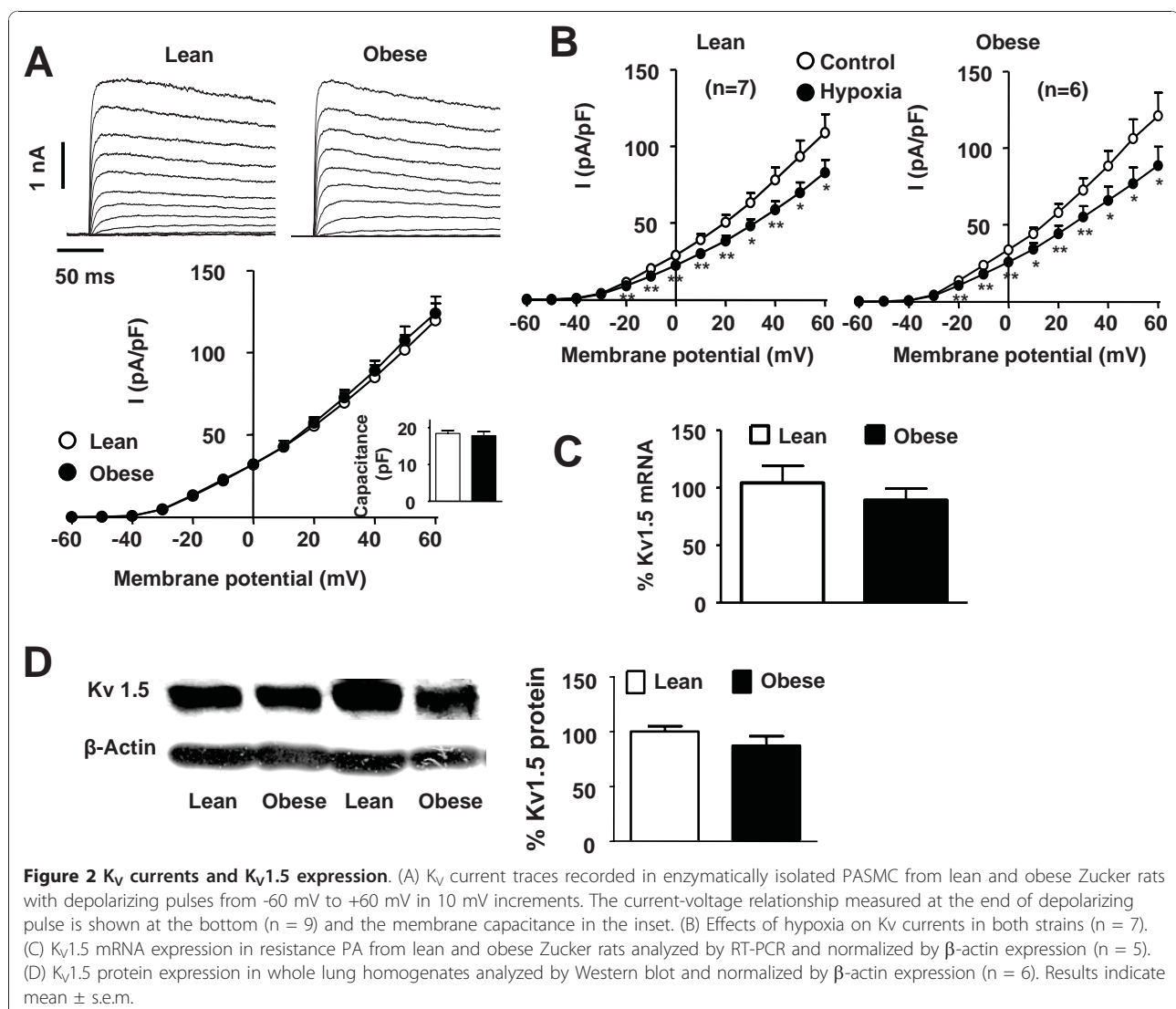
Figure 1 Heart wall thickness and BMPR2 expression. (A) Left ventricular (LV), right ventricular (RV) and septal wall thickness from lean ($n = 8$) and obese ($n = 7$) Zucker rats. (B) BMPR2 mRNA expression in resistance PA of lean and obese ($n = 5$) analyzed by RT-PCR and normalized by β -actin expression. (C) BMPR2 precursor (~ 115 kDa) and mature (~ 75 kDa) protein expression from obese and lean Zucker lungs ($n = 8$) analyzed by Western blot and normalized by β -actin expression. Results indicate mean \pm s.e.m.

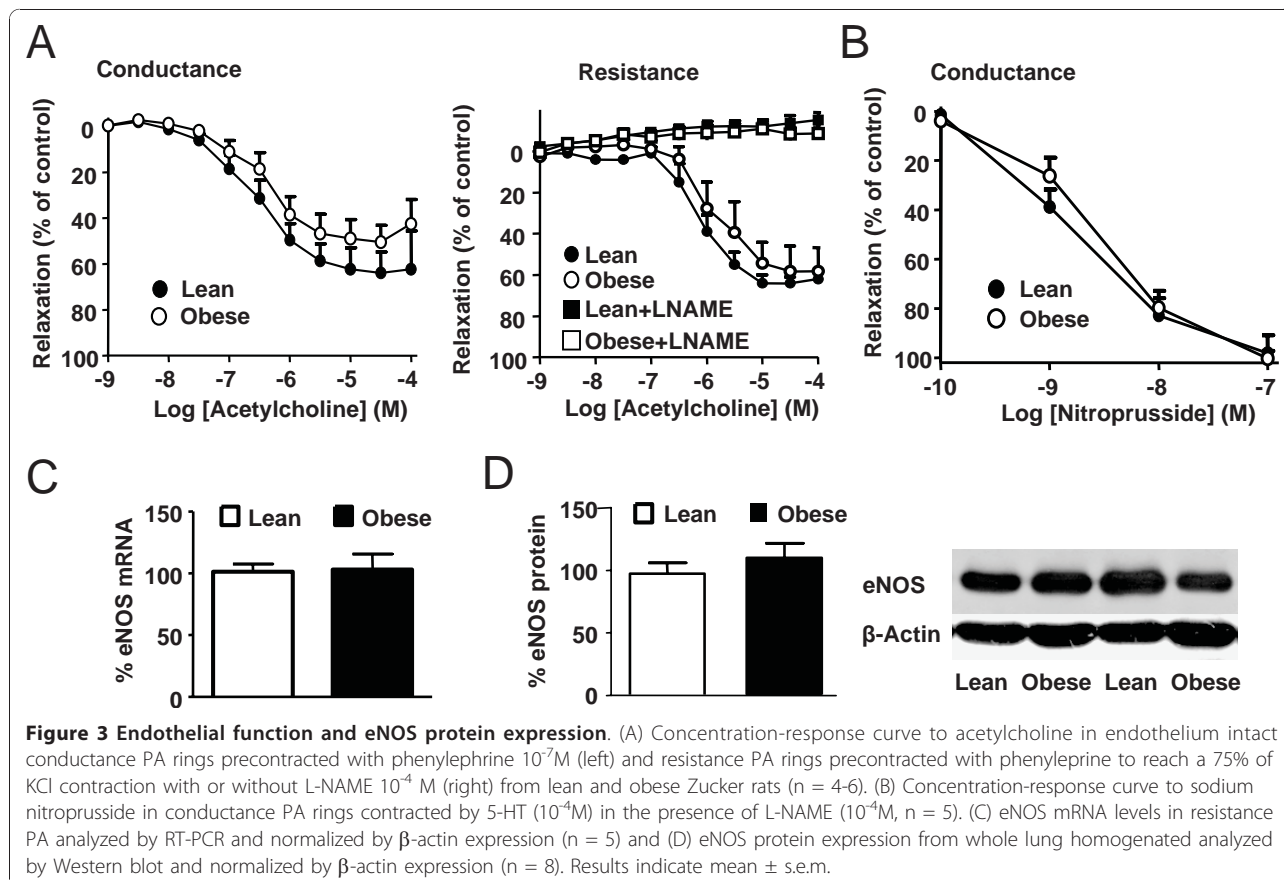
hypoxia induced a similar inhibition of K_V currents in both strains (Figure 2B). In accordance with patch-clamp data, no changes in $K_{V1.5}$ mRNA transcription in resistance PA (Figure 2C) or whole lung protein expression (Figure 2D) were found in obese as compared to lean rats.

Endothelial function

The endothelial function was tested in endothelium intact PA precontracted with phenylephrine (10^{-7} M in conductance arteries or a concentration titrated to induce a contraction 75% of the response to KCl in resistance PA). Increasing concentrations of ACh induced a similar relaxant response in obese and lean rats in conductance arteries (Figure 3A). Resistance arteries from obese rats required higher concentrations of phenylephrine to achieve a tone similar to the lean

ones ($5 \pm 2 \cdot 10^{-6}$ M vs $7 \pm 2 \cdot 10^{-7}$ M, respectively). The analysis of the concentration-response curves to ACh shows that there were not significant changes in the E_{max} values between groups in conductance (E_{max} 53 ± 7 vs $67 \pm 9\%$, respectively) or resistance vessels (E_{max} 59 ± 8 vs $66 \pm 4\%$, respectively). Similarly, the concentration of ACh required for half-maximal relaxation in conductance (pD₂ values 6.4 ± 0.1 vs 6.2 ± 0.2 , respectively) or in resistance vessels (pD₂ values 6.1 ± 0.2 vs 5.8 ± 0.2 , respectively) was similar in both groups. In the presence of the NOS inhibitor L-NAME, similar concentrations of phenylephrine were required to induce ~75% of KCl contraction in arteries from the obese and lean rats ($3 \pm 2 \cdot 10^{-8}$ M and $2 \pm 0.6 \cdot 10^{-8}$ M, respectively) but these concentrations were significantly lower than those required in the absence of L-NAME. Moreover, in the presence of this inhibitor, the relaxation to





acetylcholine was completely abolished in both strains (Figure 3D). In addition, no changes were found in the response to the endothelium-independent vasodilator sodium nitroprusside in conductance PA (Figure 3B). Expression of eNOS mRNA in resistance PA (Figure 3C) or eNOS protein in whole lung (Figure 3D) was also similar in both strains.

Contractile responses in conductance PA

Conductance pulmonary arteries were mounted in organ chambers to test the contractile response to 80 mM KCl, phenylephrine and 5-HT. No changes were found in the responses to the vasoconstrictor agents KCl (80 mM) or phenylephrine (10^{-7} M) when both groups of rats were compared (Figure 4A). A similar concentration-response curve to 5-HT was also obtained in obese and lean rats (Figure 4B, E_{\max} and pD_2 values are shown in Table 1).

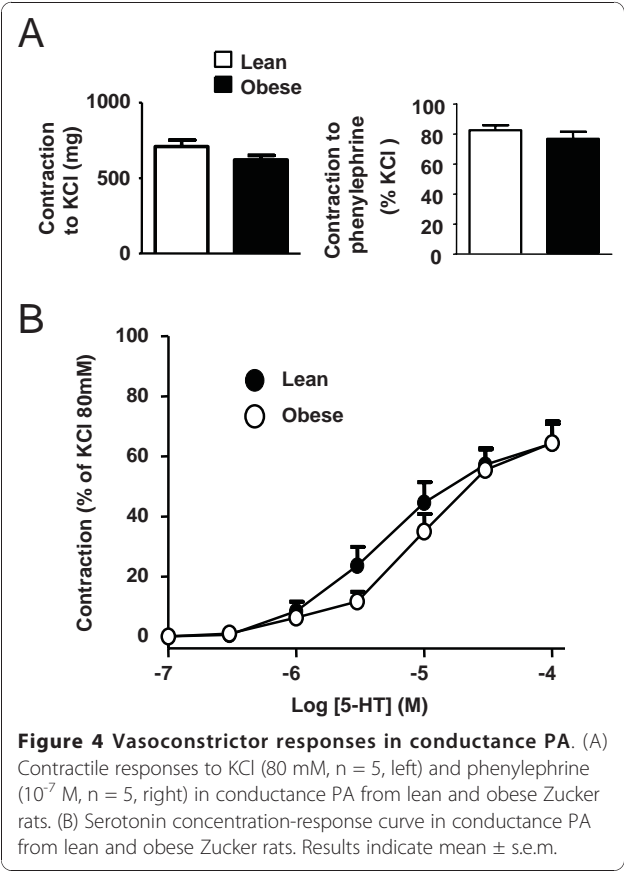
Contractile responses in resistance PA

The contractile response to 80 mM KCl in resistance PA showed a significant reduction in obese compared to lean rats. Obese rats also evidenced a significant hyporesponsiveness to hypoxia, phenylephrine and 5-HT (Figure 5 and Table 1). We further investigated the

response to the 5-HT₂ agonist α -methyl-5-HT. This agonist also showed reduced vasoconstriction responses in PA rings from obese rats (Table 1). Western blot analysis of whole lung homogenates revealed no changes in the expression of 5-HT_{2A} receptors.

Role of inducible NO synthase

To test the role of NO in the vascular hyporesponsiveness observed in resistance PA, the NO synthase inhibitor L-NAME was added on top of the maximal response to 5-HT. L-NAME induced a further contraction in both arteries but it was significantly higher in the obese rats. Therefore, no differences were found in the final tone induced by 5-HT plus L-NAME when both groups were compared, i.e. L-NAME restored the vascular hyporesponsiveness to 5-HT (Figure 6A). Interestingly, the incubation of the PA ring in the presence of the iNOS selective inhibitor 1400W prevented the reduced response to 5-HT observed in the PA from obese rats and thus the responses were similar in obese and lean rats (Figure 6B). These results suggest that iNOS might be a source of the NO responsible of the vascular hyporesponsiveness in the obese rats. The levels of iNOS mRNA expression were highly variable in the



resistance PA from both groups and even when a trend to increased transcription of iNOS mRNA was observed, the difference did not achieve statistical significance (Figure 6C). However, we found a significant increase in iNOS protein expression in resistance pulmonary arteries from obese rats (Figure 6D).

Discussion

Epidemiological studies show that insulin resistance appears to be more common in pulmonary

hypertension than in the general population [18]. Similarly, patients with type II diabetes mellitus have significantly higher prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension independent of coronary diseases, hypertension, congestive hearth failure or smoking [19]. Recent data of our group demonstrated a marked endothelial dysfunction in PA characterized by an increase of reactive oxygen species and by an increased expression of p47^{phox} [8] as well as a decreased BMPR2 lung expression together with exaggerated response of PA to 5-HT (authors unpublished observations) in rats treated with streptozotocin as an insulin-dependent diabetes model. Additionally, experimental data demonstrated that ApoE^{-/-} mice on a high fat diet develop PAH as judged by an elevated right ventricular systolic pressure and augmented RV/(LV +S) relation when compared to controls [21]. The aim of the present study was to further investigate the relationship between insulin resistance and pulmonary hypertension. For this purpose we have used a well established genetic model of obesity and insulin resistance, the obese Zucker rat, characterized by a mis-sense mutation in the leptin receptor [28] and associated with several cardiovascular complications [22,29].

Sustained elevated pulmonary pressure results in compensatory right ventricular hypertrophy and, therefore, the weight or the wall thickness of the right ventricle can be used as an indirect index of pulmonary artery pressure. Increased right ventricular weight compared to the left ventricle plus the septum weight has been described in streptozotocin-induced type 1 diabetes [30] and in insulin resistant ApoE knockout mice [21]. However, we did not find changes in the left or right ventricular wall thickness in obese Zucker rats as compared to lean ones. Fredersdorf et al. also reported similar heart weight in these strains [22]. Additionally, mutations in the BMPR2 or the diminished expression of BMPR2 has been described in lungs from PAH patients

	E _{max} (% of KCl)		pD ₂	
	Lean	Obese	Lean	Obese
Conductance PA				
Phenylephrine	82.6 ± 3.2 (5)	83.7 ± 4.1(5)	8.20 ± 0.03	8.10 ± 0.09
5-HT	64.3 ± 6.5 (5)	64.4 ± 7.2(5)	5.28 ± 0.13	5.02 ± 0.11
α-methyl-5-HT	41.0 ± 9.5 (6)	30.8 ± 6.8(6)	5.32 ± 0.13	5.46 ± 0.12
Resistance PA				
5-HT	69.2 ± 7.8 (6)	33.5 ± 9.1 * (6)	5.28 ± 0.10	4.86 ± 0.06 **
5-HT (1400W)	49 ± 7 (6)	58 ± 9 (6)	5.10 ± 0.13	5.24 ± 0.15
α-methyl-5-HT	33.7 ± 8.8 (4)	9.5 ± 3.6 * (4)	5.80 ± 0.11	5.58 ± 0.10

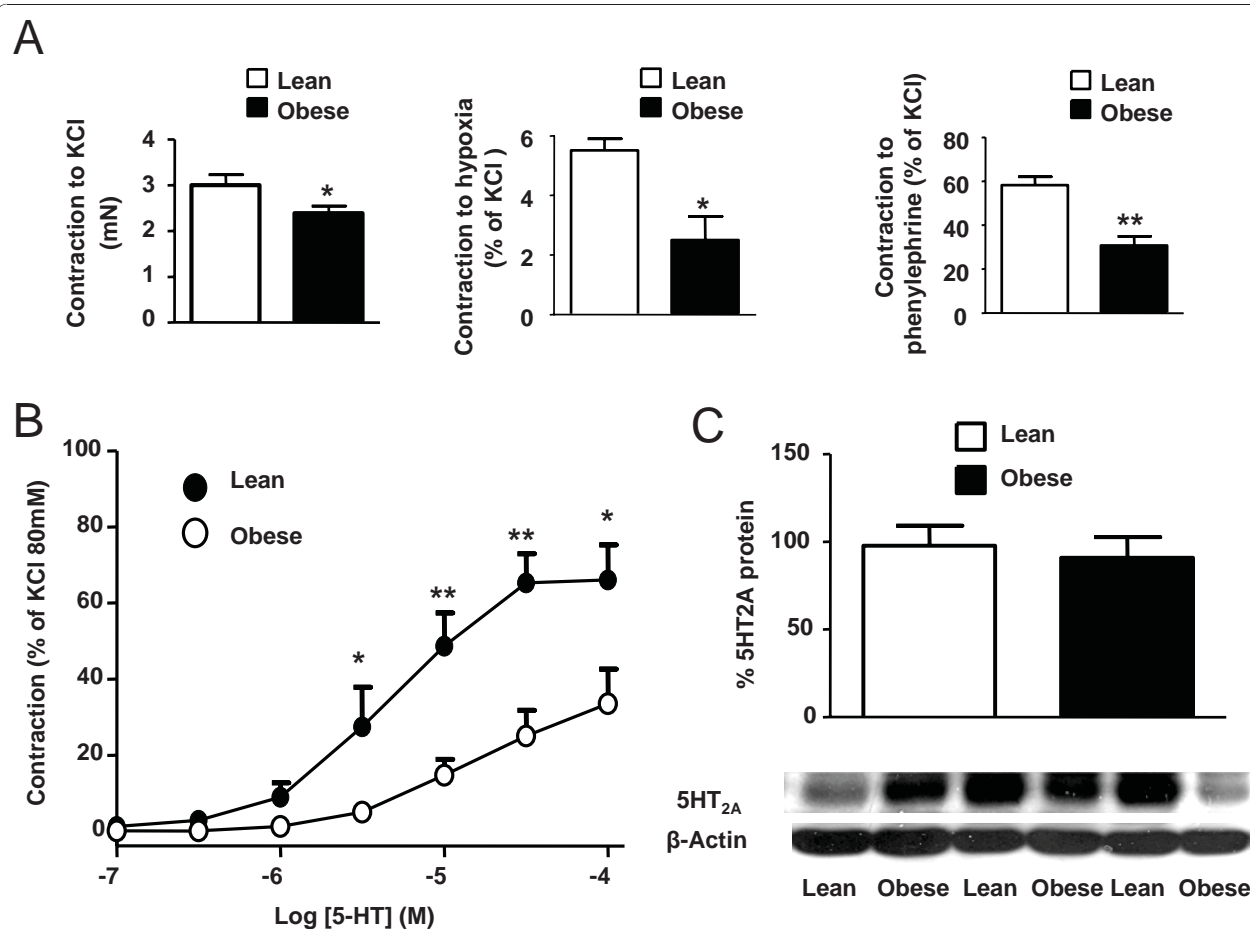
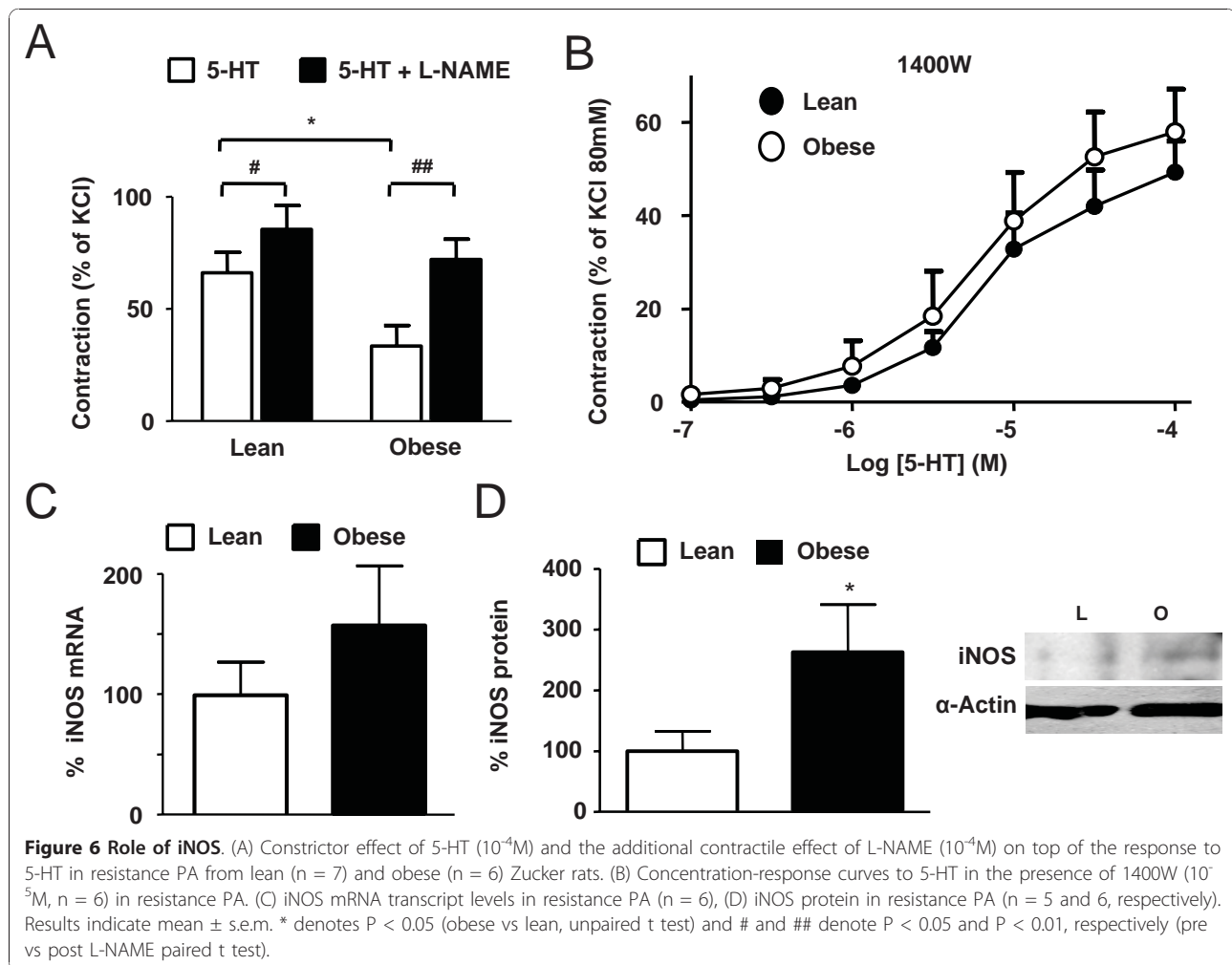


Figure 5 Vasoconstrictor responses in resistance PA. (A) Contractile responses of resistance PA induced by KCl (80 mM, $n = 8$, left), hypoxia ($n = 3$, middle) and phenylephrine (10^{-7} M, $n = 3-4$, right) in resistance PA from lean and obese Zucker rats. (B) Concentration-response curve to 5-HT ($n = 6$). (C) Whole lung protein expression of 5-HT_{2A} receptor ($n = 8$). Results indicate mean \pm s.e.m. *, ** denote $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively, obese vs lean.

[4] and from rats with monocrotaline- or hypoxia-induced PAH [5-7]. Recently we also found a downregulation in the lung expression of BMPR2 in streptozotocin-treated rats (authors unpublished observations); nonetheless, our RT-PCR analysis revealed no changes in the BMPR2-mRNA levels of obese as compared to lean rats. This was further confirmed by Western blot analysis where the expression of neither BMPR2 nor its heavier precursor (pro-BMPR2) were significantly modified.

PAH has been associated with a decrease in PASM C K_V currents and with reduced expression of K_V channels, mainly $K_{V1.5}$, $K_{V3.1}$ and $K_{V2.1}$ [14]. $K_{V1.5}$ mRNA and protein expression, K_V current density as well as the inhibitory effects of hypoxia in freshly isolated PASM C were unchanged in obese as compared to lean rats. Additionally, PASM C from obese rats showed no signs of hypertrophy as indicated by the capacitance data.

Endothelial dysfunction is characterized by a diminished vasodilator response to acetylcholine due to a reduced NO release or increase NO metabolism. Insulin resistant states and diabetes are associated to reduced endothelium-dependent relaxation and linked to cardiovascular events [31-33]. Moreover, endothelial dysfunction is a key factor in the development of retinopathy, nephropathy and atherosclerosis in both type 1 and type 2 diabetes [34,35] and also in PAH [36]. However, endothelial dysfunction is not consistently found in insulin resistance. In Zucker rats, endothelial function was impaired in the aorta and several systemic arteries [37]. In contrast, vascular reactivity and eNOS expression or phosphorylation were unchanged in hindlimb arteries [38]. Moreover, endothelial dysfunction was found in penile arteries but not in coronary arteries from obese Zucker rats in a single study [32], confirming the tissue-dependency of this effect. To our knowledge pulmonary endothelial function has not been



analyzed in the context of insulin resistance. In the present experiments, the ACh-relaxation curve in conductance and resistance PA and the eNOS mRNA and protein expression were similar in obese as compared to lean rats, indicating a preserved PA-endothelial function in this model. However, our group has recently reported endothelial dysfunction in PA of type 1 diabetic rats associated to increased ROS production and increased expression of NADPH [8] as well as hyperresponsiveness to 5-HT.

In contrast to all the above described similarities between obese and lean rats, we found differences in the constrictor response in resistance but not in conductance PA from obese rats. Resistance PA showed diminished contractile responses to hypoxia, phenylephrine, KCl and 5-HT as compared to lean resistance PA, while similar responses to phenylephrine, KCl or 5-HT were found in conductance PA. In contrast, in a type 1 rat model of diabetes decreased responses were found in conductance but not in small PA [39]. Responses to

vasoconstrictors have been also described to be reduced in some systemic beds from obese Zucker rats such as the mesenteric arteries [23] but enhanced in others such as the penile and coronary arteries [32]. Western blot analysis revealed no changes in the whole lung expression of 5-HT_{2A}, ruling out that downregulation of 5-HT_{2A} could be responsible of the reduced response to 5-HT in resistance PA.

Inducible nitric oxide synthase has emerged as a key protein in insulin resistance and obesity. Moreover, iNOS has been directly related to cardiac contractile dysfunction [40] and in vascular complications derived from insulin resistance [41,42]. We found that the contractile response to 5-HT was increased by the non selective NO synthase inhibitor L-NAME much more effectively in the obese than in the lean rats, suggesting that increased NO synthesis was responsible for the vascular hyporesponsiveness in the obese rats. Furthermore, the incubation with selective iNOS inhibitor 1400W restored 5-HT response curve suggesting that iNOS was

responsible for this exaggerated NO synthesis. Since iNOS activity is primarily regulated at a transcriptional level and that once expressed the enzyme produces large amounts of NO, we investigated iNOS expression levels. The levels of iNOS mRNA tended to be higher in resistance PA from obese rats but differences did not reach statistical significance due to the high variability within our experimental samples. However the protein iNOS expression was significantly higher in obese resistance PA than in lean resistance PA. iNOS upregulation has also been found in other tissues such as the aorta, the visceral adipose tissue and the heart in the Zucker obese rats and other models of insulin resistance [40,42,43]. There are a large number of studies showing that increased expression of iNOS induced by lipopolysaccharide (LPS) is accompanied by endothelial dysfunction, as opposed to the present study. Moreover, iNOS gene deletion or pharmacological inhibition prevents LPS-induced endothelial dysfunction suggesting a cause-effect relationship [44]. However, iNOS overexpression induced by LPS is much larger (e.g. > 10 fold increase) than in the present study. More importantly, it is peroxynitrite (and probably not NO itself) produced in the reaction of iNOS-derived NO with superoxide which is responsible for endothelial dysfunction [45]. We have not measured superoxide or peroxynitrite in resistance PA, but the lack of endothelial dysfunction suggests that oxidative stress is not increased in these arteries.

Conclusions

Herein we characterized for the first time the effects of insulin resistance in the pulmonary circulation of the obese Zucker rats. Some studies have related insulin resistance with PAH in humans and in other animal models but we did not find any of the characteristic features related with this pathology in the obese Zucker rat at the age of 17-18 weeks. However, this rat strain showed pulmonary vascular hyporesponsiveness in resistance arteries which could be prevented by inhibition of iNOS.

List of abbreviations

ACh: acetylcholine; BMPR2: bone morphogenetic protein receptor 2; E_{max} : maximum response; LV: left ventricle; PA: pulmonary arteries; PAH: pulmonary arterial hypertension; PASMC: pulmonary artery smooth muscle cells; pD₅₀: negative logarithm of the molar concentration that causes 50% of the maximum response; RV: right ventricle; S: septum.

Acknowledgements

We thank Bianca Barreira for excellent technical assistance. This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (grants SAF2008-03948 and AGL2007-66108) and Mutua Madrileña.

Authors' contributions

JM-S performed the Western blots and electrophysiological measurements and wrote the first draft of the manuscript, CM performed the PCRs and vascular reactivity, EM measured hearts and glucose, AC and LM

supervised and coordinated the study. FP-V conceived the study and wrote the final manuscript. All authors contributed to the analysis and interpretation of the data. All authors have read and approved the final submission.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 November 2010 Accepted: 22 April 2011

Published: 22 April 2011

References

- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, et al: **Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**:S20-31.
- Cogolludo A, Moreno L, Villamor E: **Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary arterial hypertension: implications for vasodilator therapy.** *Pharmacology* 2007, **79**:65-75.
- Chan SY, Loscalzo J: **Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension.** *J Mol Cell Cardiol* 2008, **44**:14-30.
- Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW: **Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor.** *Circulation* 2002, **105**:1672-1678.
- Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, Hecker M, Zakrzewicz A, Kouri FM, Peters DM, Dumitrescu R, Seeger W, Knaus P, et al: **Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:1072-1078.
- Takahashi H, Goto N, Kojima Y, Tsuda Y, Morio Y, Muramatsu M, Fukuchi Y: **Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, **290**:L450-458.
- Long L, MacLean MR, Jeffery TK, Morecroft I, Yang X, Rudarakanchana N, Southwood M, James V, Trembath RC, Morrell NW: **Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice.** *Circ Res* 2006, **98**:818-827.
- Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F: **Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295**:L727-732.
- Rodat L, Savineau JP, Marthan R, Guibert C: **Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries.** *Pflügers Arch* 2007, **454**:41-51.
- Csiszar A, Labinsky N, Olson S, Pinto JT, Gupta S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, et al: **Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.** *Hypertension* 2009, **54**:668-675.
- Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O: **Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats.** *Cardiovasc Res* 2003, **60**:692-699.
- Cogolludo A, Perez-Vizcaino F: **5-HT receptors and K(V) channel internalization.** *Adv Exp Med Biol* 2010, **661**:391-401.
- Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, Burg ED, Brevnova EE, Conger D, Nicholson A, Rana BK, Channick RN, Rubin LJ, et al: **Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**:C1837-1853.
- Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB, Rubin LJ: **Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension.** *Circulation* 1998, **98**:1400-1406.
- Kirk EP, Klein S: **Pathogenesis and pathophysiology of the cardiometabolic syndrome.** *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2009, **11**:761-765.
- Cherian B, Meka N, Katragadda S, Arora R: **Therapeutic implications of diabetes in cardiovascular disease.** *Am J Ther* 2009, **16**:e51-59.
- Fouty B: **Diabetes and the pulmonary circulation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295**:L725-726.
- Zamanian RT, Hansmann G, Snook S, Lilienfeld D, Rappaport KM, Reaven GM, Rabinovitch M, Doyle RL: **Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2009, **33**:318-324.

19. Movahed MR, Hashemzadeh M, Jamal MM: **The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type II diabetes mellitus.** *Chest* 2005, **128**:3568-3571.
20. Robbins IM, Newman JH, Johnson RF, Hemnes AR, Fremont RD, Piana RN, Zhao DX, Byrne DW: **Association of the metabolic syndrome with pulmonary venous hypertension.** *Chest* 2009, **136**:31-36.
21. Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, Rabinovitch M: **Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation.** *Circulation* 2007, **115**:1275-1284.
22. Fredersdorf S, Thumann C, Uluhan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J: **Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats.** *Cardiovasc Pathol* 2004, **13**:11-19.
23. Romanko OP, Stepp DW: **Reduced constrictor reactivity balances impaired vasodilation in the mesenteric circulation of the obese Zucker rat.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **289**:H2097-2102.
24. Song D, Yao R, Pang CC: **Altered vasodilator role of nitric oxide synthase in the pancreas, heart and brain of rats with spontaneous type 2 diabetes.** *Eur J Pharmacol* 2008, **591**:177-181.
25. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeno L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F: **Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization.** *Circ Res* 2006, **98**:931-938.
26. Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menendez C, Castaneda J, Gonzalez C, Villamor E, Perez-Vizcaino F: **Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction.** *Cardiovasc Res* 2009, **82**:296-302.
27. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F: **Postnatal maturational shift from PKC ζ and voltage-gated K⁺ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction.** *Cardiovasc Res* 2005, **66**:84-93.
28. Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K: **Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs—identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **225**:75-83.
29. Osmond JM, Mintz JD, Dalton B, Stepp DW: **Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the Zucker rat.** *Hypertension* 2009, **53**:381-386.
30. Al-Shafei AI, Wise RG, Gresham GA, Bronns G, Carpenter TA, Hall LD, Huang CL: **Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats.** *J Physiol* 2002, **538**:541-553.
31. Frisbee JC: **Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **289**:R307-R316.
32. Villalba N, Martinez P, Briones AM, Sanchez A, Salas M, Garcia-Sacristan A, Hernandez M, Benedito S, Prieto D: **Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, **297**:H696-707.
33. Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, George S, Kozicky M, Neito V, Recchia F, Stanley W, Wolin MS, Gupte SA: **Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, **297**:H153-162.
34. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW: **Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy.** *Cardiovasc Res* 1997, **34**:55-68.
35. Jay D, Hitomi H, Griendling KK: **Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications.** *Free Radic Biol Med* 2006, **40**:183-192.
36. Coggins MP, Bloch KD: **Nitric oxide in the pulmonary vasculature.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:1877-1885.
37. Toblli J, Cao G, Rivas C, Munoz M, Giani J, Dominici F, Angerola M: **Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats.** *J Hypertens* 2010, **28**:1007-1019.
38. Fulton D, Harris MB, Kemp BE, Venema RC, Marrero MB, Stepp DW: **Insulin resistance does not diminish eNOS expression, phosphorylation, or binding to HSP-90.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, **287**:H2384-2393.
39. Gurney AM, Howarth FC: **Effects of streptozotocin-induced diabetes on the pharmacology of rat conduit and resistance intrapulmonary arteries.** *Cardiovasc Diabetol* 2009, **8**:4.
40. Song D, Kuo KH, Yao R, Hutchings SR, Pang CC: **Inducible nitric oxide synthase depresses cardiac contractile function in Zucker diabetic fatty rats.** *Eur J Pharmacol* 2008, **579**:253-259.
41. Gunnnett CA, Heistad DD, Faraci FM: **Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes.** *Stroke* 2003, **34**:2970-2974.
42. Noronha BT, Li JM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT: **Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity.** *Diabetes* 2005, **54**:1082-1089.
43. Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M: **Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats.** *Obesity (Silver Spring)* 2008, **16**:2081-2087.
44. Chauhan SD, Seggala G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A: **Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice.** *FASEB J* 2003, **17**:773-775.
45. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D: **A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **319**:73-81.

doi:10.1186/1465-9921-12-51

Cite this article as: Moral-Sanz et al.: Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats. *Respiratory Research* 2011 **12**:51.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



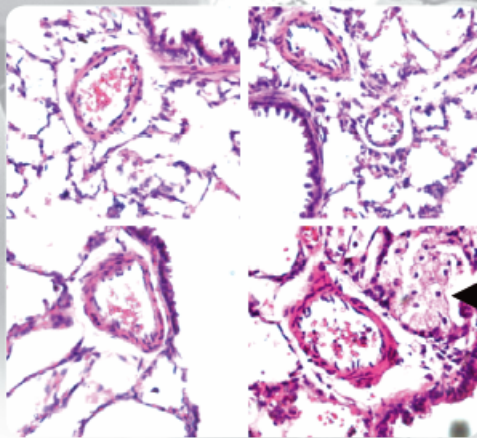
Editor's Choice, May 2012

Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats.

Experimental Physiology

Translation and Integration

Volume 97 / Issue 5 / May 2012



A publication of The Physiological Society

Research Paper

Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats

Javier Moral-Sanz^{1,2}, Jose G. Lopez-Lopez³, Carmen Menendez^{1,2}, Enrique Moreno², Bianca Barreira², Daniel Morales-Cano^{1,2}, Lucia Escolano^{1,2}, Pilar Fernandez-Segoviano^{2,4}, Eduardo Villamor⁵, Angel Cogolludo^{1,2}, Francisco Perez-Vizcaino^{1,2} and Laura Moreno^{1,2}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Spain

²Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain ³Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico

⁴Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Getafe, Spain

⁵Department of Pediatrics, Maastricht University Medical Center (MUMC+), School for Oncology and Developmental Biology (GROW), Maastricht, The Netherlands

Although type 1 and type 2 diabetes are strongly associated with systemic cardiovascular morbidity, the relationship with pulmonary vascular disease had been almost disregarded until recent epidemiological data revealed that diabetes might be a risk factor for pulmonary hypertension. Recent experimental studies suggest that diabetes induces changes in lung function insufficient to elevate pulmonary pressure. The aim of this study was to assess the effects of diabetes on the sensitivity to other risk factors for pulmonary hypertension. We therefore analysed the effects of the combination of diabetes with exposure to moderate hypoxia on classical markers of pulmonary hypertension. Control (saline-treated) and diabetic (70 mg kg⁻¹ streptozotocin-treated) male Wistar–Kyoto rats were followed for 4 weeks and exposed to normoxia or moderate normobaric hypoxia (14%) for another 2 weeks. Hypoxia, but not diabetes, strongly reduced voltage-gated potassium currents, whereas diabetes, but not hypoxia, induced pulmonary artery endothelial dysfunction. Both factors independently induced pulmonary vascular remodelling and downregulated the lung bone morphogenetic protein receptor type 2. However, diabetes, but not hypoxia, induced pulmonary infiltration of macrophages, which was markedly increased when both factors were combined. Diabetes plus hypoxia induced a modest increase in diastolic and mean pulmonary artery pressure and right ventricular weight, while each of the two factors alone had no significant effect. The pattern of changes in markers of pulmonary hypertension was different for moderate hypoxia and diabetes, with no synergic effect except for macrophage recruitment, and the combination of both factors was required to induce a moderate elevation in pulmonary arterial pressure.

(Received 28 September 2011; accepted after revision 13 January 2012; first published online 13 January 2012)

Corresponding author L. Moreno: Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain. Email: lmorenog@med.ucm.es

Pulmonary hypertension (PH) is a syndrome characterized by elevated pulmonary blood pressure (Simonneau *et al.* 2009). Pulmonary hypertension exhibits a complex pathophysiology, unlikely to be explained by a single factor (Chan & Loscalzo, 2008; Rabinovitch, 2008). Mutations in the bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) underlie many heritable and sporadic cases of PH (The International PPH

Consortium *et al.* 2000), and downregulation of its expression is also a common feature of several forms of PH (Atkinson *et al.* 2002). Inactivation, downregulation or gene polymorphisms of voltage-gated potassium (K_V) channels have also been implicated (Yuan *et al.* 1998). Loss of NO bioavailability and the subsequent endothelial dysfunction is an additional component of the pathophysiology of PH (Coggins & Bloch, 2007).

Although type 1 and type 2 diabetes are strongly associated with systemic cardiovascular morbidity (Rutter *et al.* 2005), the relationship with pulmonary vascular disease has been almost disregarded (Fouty, 2008). However, recent epidemiological and experimental studies suggest a link between diabetes and pulmonary arterial disease (Movahed *et al.* 2005; Makarevich *et al.* 2007; Zamanian *et al.* 2009). Both type 1 and type 2 diabetes are associated with a modestly impaired pulmonary function in a restrictive pattern (van den Borst *et al.* 2010). Furthermore, patients with diabetes mellitus type 2 have significantly higher prevalence of PH that is independent of coronary artery disease, hypertension, congestive heart failure or smoking (Movahed *et al.* 2005; Zamanian *et al.* 2009). Pulmonary hypertension was also more severe in patients with chronic obstructive pulmonary disease plus diabetes mellitus type 2 compared with patients with only chronic obstructive pulmonary disease (Makarevich *et al.* 2007). Moreover, maternal diabetes is an independent risk factor for persistent PH of the newborn (Hernández-Díaz *et al.* 2007). In addition, there is some experimental evidence linking diabetes with PH. Thus, male *apoE*^{-/-} mice on a high-fat diet, an animal model associated with insulin resistance, developed PH, which was prevented by the antidiabetic drug rosiglitazone (Hansmann *et al.* 2007). However, obese Zucker rats, a well-established model of obesity and insulin resistance associated with systemic vascular dysfunction, did not show any of the characteristic features of pulmonary hypertension but rather a reduced vasoconstrictor response, which could be prevented by inhibition of inducible nitric oxide synthase (Moral-Sanz *et al.* 2011). In rats treated with streptozotocin, a widely used model of type 1 diabetes, we found a number of changes in lung protein expression and pulmonary vascular reactivity characteristic of clinical and experimental pulmonary hypertension (such as endothelial dysfunction associated with increased superoxide production or vascular hyperresponsiveness to serotonin), but insufficient to elevate pulmonary pressure (Lopez-Lopez *et al.* 2008, 2011). Moreover, these alterations seemed to be secondary to the high blood glucose rather than being a direct effect of streptozotocin, because both endothelial dysfunction and hyperresponsiveness to serotonin were reduced by cotreatment with insulin (Lopez-Lopez *et al.* 2011). Right ventricular hypertrophy has also been found in this model (Al-Shafei *et al.* 2002).

We hypothesized that type 1 diabetes could lead to elevated pulmonary artery (PA) pressure by itself or in combination with moderate hypoxia. We intentionally chose a mild level of hypoxia (14% O₂; partial pressure of O₂ equivalent to 3700 m of altitude), which *per se* has modest effects on pulmonary haemodynamics, to analyse whether diabetes might increase the 'hypoxia sensitivity', as occurs in the fawn-

Table 1. Diabetes, but not moderate hypoxia, induces loss of body weight

	Body weight (g) on day 0	Body weight (g) on day 42
Control normoxia	324 ± 14	389 ± 17
Diabetic normoxia	337 ± 19	259 ± 14*
Vehicle hypoxia	322 ± 13	385 ± 17
Diabetic hypoxia	339 ± 20	243 ± 10*

hooded rat (Sato *et al.* 1992) or the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mouse (Fagan *et al.* 1999). Therefore, the present study was designed to analyse the effects of streptozotocin and moderate hypoxia on PA pressure and pulmonary markers of PH, including pulmonary vascular remodelling, expression of BMPR2, K_v currents, endothelial dysfunction and right ventricular hypertrophy.

Methods

Animals and treatments

The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (publication no. 85-23, revised 1996), and the procedures were approved by our institutional Ethical Committee. Male Wistar-Kyoto (WKY) rats were used. Rats were randomly divided into a control and a diabetic group. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 70 mg kg⁻¹ streptozotocin (control animals were injected with saline) and followed for 6 weeks. Blood glucose was analysed using a clinical glucometer. Streptozotocin led to increased blood glucose (>300 mg dl⁻¹) and a decrease in body weight by 30–40% as compared to control animals (Table 1). Four weeks after streptozotocin treatment, rats were further randomly assigned to normoxia or moderate normobaric hypoxia (14 ± 1%) for an additional period of 2 weeks (*n* = 7 in each group). For this purpose, rats were introduced in sealed glass cages containing a CO₂ absorbent and ventilated with room air (normoxia) or with a mixture of N₂ and room air. The O₂ and CO₂ were monitored in the outflow. This level of hypoxia led to a moderate but significant increase in blood haematocrit (44 ± 2% versus 51 ± 2%, *P* < 0.05) but had no effect on body weight (Table 1).

Pressure measurements

Rats were anaesthetized with 80 mg kg⁻¹ ketamine (Merial, Lyon, France) plus 8 mg kg⁻¹ xylazine (KVP Pharma und Veterinär-Produkte GmbH, Kiel, Germany), i.p. and ventilated with room air (tidal volume

9 ml kg⁻¹, 60 breaths min⁻¹, positive end-expiratory pressure 2 cmH₂O). Right ventricular systolic pressure (RVSP) and systolic, diastolic and mean pulmonary arterial pressures (SPAP, DPAP and MPAP) were then measured in open-chest rats with a pressure transducer via a catheter advanced through the right ventricle into the PA. It should be noted that the pressure and heart rate values obtained in anaesthetized open-chest rats may represent an underestimation of the values in closed-chest conscious animals.

Lung histology

The right lung was inflated *in situ* with formol saline through the right bronchus and embedded in paraffin. Lung sections were stained with Haematoxylin and Eosin and Masson trichrome techniques and examined by light microscopy, and elastin was visualized by its green autofluorescence. Small arteries (25–300 µm outer diameter) were analysed in a blinded fashion and categorized as muscular, partly muscular or non-muscular as previously described (Meyrick *et al.* 1978). The outside diameter (external elastic lamina) and inside diameter (internal elastic lamina) of pulmonary arteries were measured using ImageJ (Ver 1.41, NIH, Bethesda, MD, USA). Five or six vessels with an external diameter ranging from 25 to 75 µm were analysed from each individual animal. The medial wall thickness (calculated as external elastic lamina diameter minus the internal lamina diameter), the cross-sectional medial wall area and the total cross-sectional area were calculated. The following two indices were used to quantify vascular remodelling: percentage medial wall thickness (medial wall thickness/internal diameter × 100) and percentage medial wall area (cross-sectional medial wall area/total cross-sectional area × 100).

Immunohistochemical analysis

Lung sections were deparaffinized and rehydrated. Sections were incubated with a sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate and 0.05% Tween 20, pH 6) at 95°C for 20 min to retrieve the antigens. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 1% H₂O₂ in PBS for 20 min. CD68 staining was performed using an anti-CD68 (ED1, 1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and ImmunoCruzTM mouse ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology). Sections were counterstained with Haematoxylin. Quantification of the percentage of CD68-positive cells was performed using ImmunoRatio (Tuominen *et al.* 2010).

Vascular reactivity

Intrapulmonary artery rings (2–3 mm long, ~0.5–0.8 mm internal diameter) were dissected and mounted in

Krebs solution under 0.75 g of resting tension in organ chambers as previously described (Cogolludo *et al.* 2006). After equilibration, rings were contracted by 10⁻⁷ M phenylephrine, and concentration–response curves to acetylcholine (10⁻⁹ to 3 × 10⁻⁵ M) were performed by cumulative addition.

K_v current recordings

For isolation smooth muscle cells, endothelium-denuded PA were cut into small segments (2 mm × 2 mm) and placed in Ca²⁺-free physiological salt solution containing (in mg ml⁻¹): 1 papain, 0.8 dithiothreitol and 0.7 albumin. Tissues were incubated in this solution at 4°C for 10 min and then agitated for 7 minutes at 37°C. Afterwards, tissues were washed in Ca²⁺-free physiological salt solution and disaggregated using a wide-bore, smooth-tipped pipette. Cells were stored at 4°C and used within 8 h of isolation. Membrane currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as previously described (Cogolludo *et al.* 2006).

Western blot analysis

Pulmonary artery or whole-lung homogenates were run on SDS-PAGE, and Western blot was performed as previously described (Moreno *et al.* 2004) using primary monoclonal mouse anti-β-actin (Sigma) or anti-BMPR2 antibodies (BD Transduction, Lexington, KY, USA).

Myeloperoxidase activity assay

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured in frozen lung tissue, homogenized and centrifuged. Pellets were resuspended and subjected to three cycles of freezing and thawing prior to a final centrifugation step. The supernatants generated were assayed in triplicate for MPO activity using kinetic readings over 6 min at 460 nm (10 µl sample with 90 µl reaction buffer containing 50 mM potassium phosphate buffer, 0.167 mg ml⁻¹ of O-dianisidine dihydrochloride and 0.0006% H₂O₂).

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM of measurements. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and subsequent Dunnett's *post hoc* test. The distribution of PA into muscular, partly muscular and non-muscular was analysed by a χ² test. A value of *P* < 0.05 was considered statistically significant. The maximal drug effect (*E*_{max}) and the drug concentration producing 50% of the *E*_{max} (*EC*₅₀) expressed as the negative log molar value (p*D*₂) were calculated from the curves for each artery.

Results

Diabetes, but not moderate hypoxia, induces PA endothelial dysfunction

We have recently shown that diabetes induces PA endothelial dysfunction secondary to enhanced NADPH oxidase-derived superoxide production in Sprague–Dawley rats (Lopez-Lopez *et al.* 2008). Likewise, diabetes significantly ($P < 0.05$) decreased the maximal relaxation evoked by acetylcholine in isolated PA in WKY rats (Fig. 1). In contrast, moderate hypoxia did not modify the relaxant effects of acetylcholine. Diabetic plus hypoxic animals showed similar relaxations to those of normoxic diabetic animals. Thus, diabetes reduced the E_{\max} from 60 ± 6 to $40 \pm 9\%$ in normoxia and from 65 ± 6 to $44 \pm 11\%$ in moderate hypoxia, without significant changes in the sensitivity of the vessels to acetylcholine (pD_2 values of 7.7 ± 0.2 , 7.3 ± 0.3 , 7.8 ± 0.4 and 7.4 ± 0.2 , in control, diabetic, hypoxic and diabetic plus hypoxic groups respectively).

K_V currents are decreased in moderate hypoxia, but not in diabetes

In freshly isolated PA smooth muscle cells, membrane capacitance, an estimate of membrane surface, was similar in the four groups (inset in Fig. 2B). As expected, a significant decrease in the amplitude of the K_V currents was observed in moderately hypoxic animals (Fig. 2A and

B). However, diabetes did not produce any significant effect on the K_V currents. Diabetic plus hypoxic animals showed similar K_V currents to those of hypoxic control animals.

Lung BMPR2 expression is downregulated in diabetes and hypoxia

As BMPR2 is a key protein involved in PH, we examined its expression in diabetic lungs and found that BMPR2 was strongly downregulated both by diabetes and by moderate hypoxia (Fig. 3).

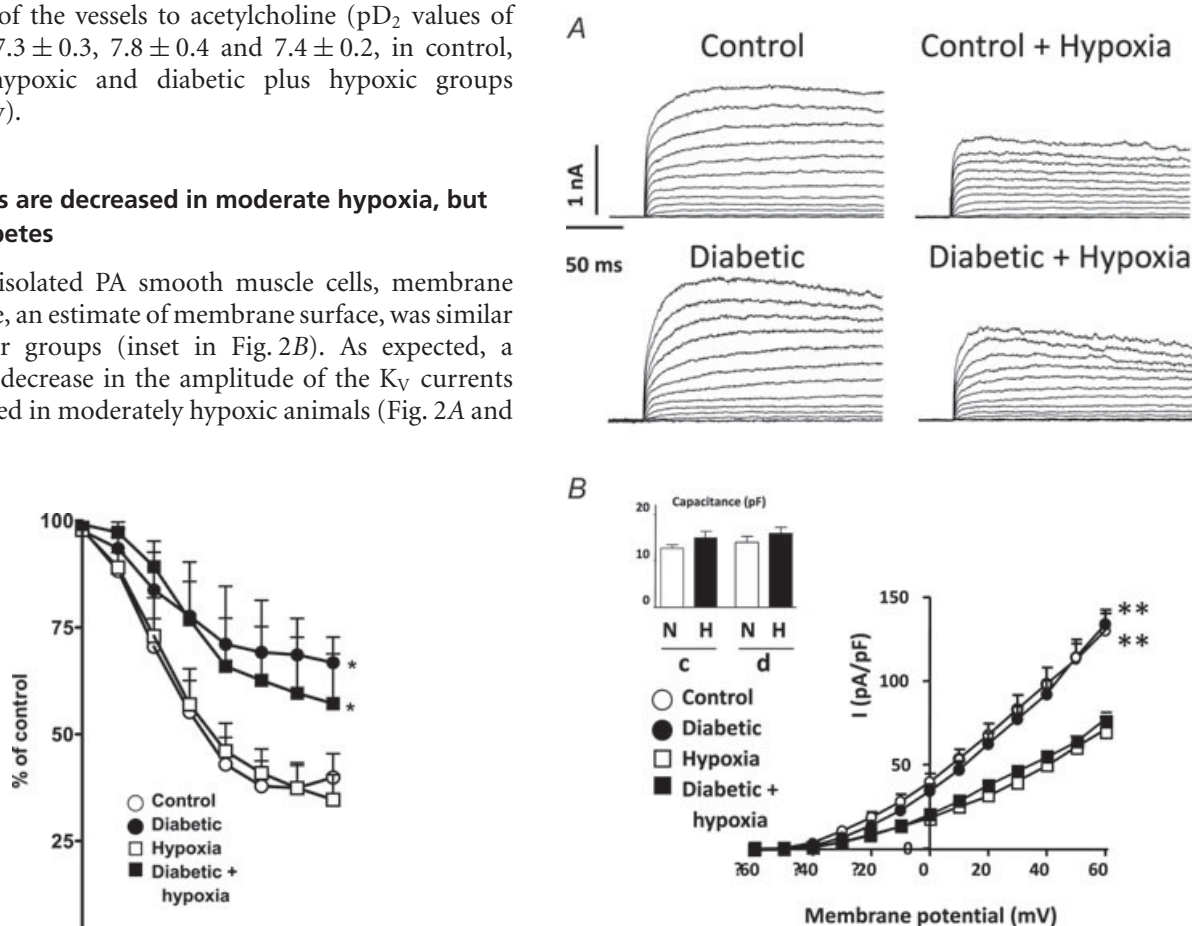


Figure 2. Moderate hypoxia, but not diabetes, inhibits K_V currents

A, K_V currents recorded in isolated PA smooth muscle cells for depolarization pulses from -60 to $+60$ mV from a holding potential of -60 mV from control and diabetic WKY rats exposed to normoxia or moderate hypoxia. B, current–voltage relationships measured at the end of the pulse. The inset shows cell capacitance (N and H indicate normoxia and hypoxia, respectively, while c and d indicate control and diabetic, respectively). $^{**}P < 0.01$ versus normoxic control. Each column or symbol represents the mean value \pm SEM ($n = 4$ –8).

Figure 1. Diabetes, but not moderate hypoxia, induces endothelial dysfunction

Relaxant effects of the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine (ACh) in PA stimulated with phenylephrine from control, diabetic, hypoxic and hypoxic plus diabetic WKY rats. *Significant difference ($P < 0.05$) in the E_{\max} versus normoxic control. Each symbol represents the mean value \pm SEM ($n = 5$ –6).

Histological changes and macrophage infiltration in lungs in diabetic and hypoxic rats

Small pulmonary arteries (25–300 μm) in lung sections were classified as muscular, partly muscular and non-muscular arteries (Fig. 4A). Both diabetes and hypoxia increased the percentage of muscular arteries, with a corresponding decrease in partly muscular and non-muscular arteries. No further increase in arterial muscularization was found in lungs from diabetic animals exposed to hypoxia. Likewise, both diabetes and hypoxia increased the medial wall thickness of pulmonary arteries (25–75 μm), but no additive effect was found with the combination of both factors. In several sections from diabetic rats exposed to either normoxia or hypoxia, there was apparent infiltration of inflammatory cells (e.g. Fig. 4Bd). Therefore, we analysed the MPO activity in lung tissue homogenates as a marker of neutrophil and macrophage parenchymal infiltration. As expected, diabetes increased MPO activity two- to threefold in both normoxia and hypoxia (Fig. 5A), while hypoxia alone had no significant effect. Immunohistochemistry demonstrated that pulmonary infiltration in diabetic animals corresponded to CD68-positive macrophages, and it was markedly increased by exposure to moderate hypoxia (Fig. 5B and C).

Pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy

We found no significant changes in RVSP, SPAP, DPAP or MPAP or in the ratios of the free wall of the right ventricle (RV) to body weight (BW) and free wall of the left ventricle (LV) plus septum (S) to BW in rats exposed to moderate hypoxia or diabetes (Fig. 6). The Fulton index [i.e. $\text{RV}/(\text{LV} + \text{S})$] was elevated in hypoxia, but not in

diabetes, and the latter reduced heart rate. However, the combination of hypoxia and diabetes induced a significant elevation in DPAP or MPAP and RV/BW.

Discussion

Despite the well-known link between diabetes and systemic cardiovascular morbidity, the relationship with pulmonary vascular disease has been largely overlooked. In our study, both diabetes and moderate hypoxia induced pulmonary vascular remodelling, but had no significant effect on MPAP pressure. The combination of both factors was required to elevate MPAP consistently and induce RV hypertrophy. The effects were moderate when compared with standard models of PH (e.g. monocrotaline or 10% O_2), which show larger increases in MPAP and RV hypertrophy and high mortality. Interestingly, a number of parameters known to be associated with PH, such as BMPR2 downregulation, K_V current inhibition, inflammation and endothelial dysfunction, were differently affected by diabetes and moderate hypoxia.

Mutations in BMPR2 underlie many heritable and sporadic cases of PH. In addition, both clinical and experimental forms of PH are associated with a diminished pulmonary expression of BMPR2 (Atkinson *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2006; Morty *et al.* 2007). Likewise, in diabetic lungs and those exposed to moderate hypoxia, BMPR2 protein was downregulated. Moreover, reduced BMPR2 expression has also been reported in diabetic rat kidneys (Wang *et al.* 2001). This altered lung protein expression preceded the development of elevated PA pressure, but was associated with PA muscularization. Diminished BMPR2 expression may lead to a misbalance towards proliferative processes that could be related to

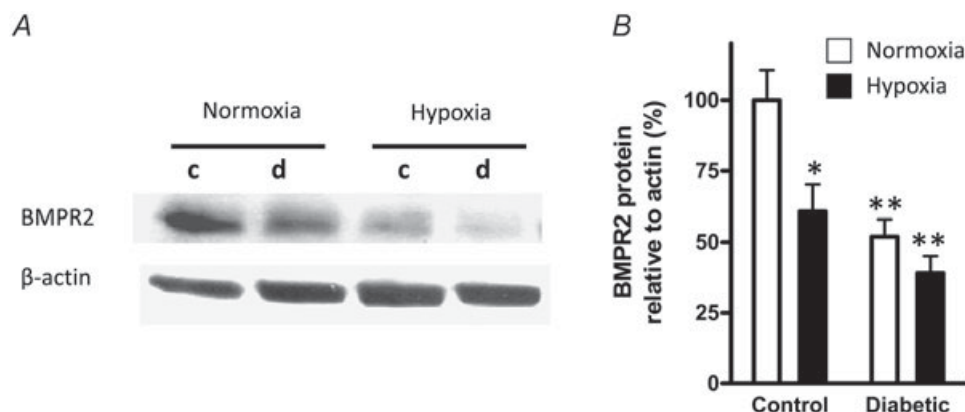


Figure 3. Diabetes and moderate hypoxia downregulate bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2)

Expression of BMPR2 in control and diabetic WKY rats exposed to normoxia or moderate hypoxia measured by Western blot. Representative blots (A) and averaged densitometric values (B) are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus normoxic control. Each column represents the mean \pm SEM ($n = 4$ –5).

the increased percentage of muscular arteries found in diabetic and hypoxic lungs. Our data are consistent with the concept that BMPR2 mutation or downregulation is a predisposing factor, but may not be sufficient to develop PH. Likewise, *Bmpr2*^{+/-} mice have normal PA pressure but develop more severe pulmonary hypertension after exposure to an additional stimulus, such as normobaric hypoxia (Long *et al.* 2006; Frank *et al.* 2008), monocrotaline (Song *et al.* 2005), overexpression of 5-lipoxygenase (Song *et al.* 2005) or infusion of 5-HT (Long *et al.* 2006).

A decrease in K_V currents associated to reduced expression of $K_{V1.5}$, $K_{V3.1}$ and $K_{V2.1}$ channels has been found in animal models and humans with PH (Yuan

et al. 1998; Bonnet *et al.* 2006; Guignabert *et al.* 2006). In diabetic rats, there were no significant changes in K_V currents. In contrast, despite the similar haemodynamic effects, moderate hypoxia induced a strong reduction in K_V currents in both control and diabetic rats. This is consistent with the K_V current attenuation and $K_{V1.5}$ and $K_{V2.1}$ downregulation induced by moderate hypoxia, which occurs even with very short periods of hypoxia (Hong *et al.* 2004). Our findings that the profound suppression of the K_V current in moderate hypoxia is not associated with significant haemodynamic changes strongly suggest that, as in the case of BMPR2 mutations, reduction of K_V current amplitude is insufficient *per se* to cause PH, but may predispose to PH development

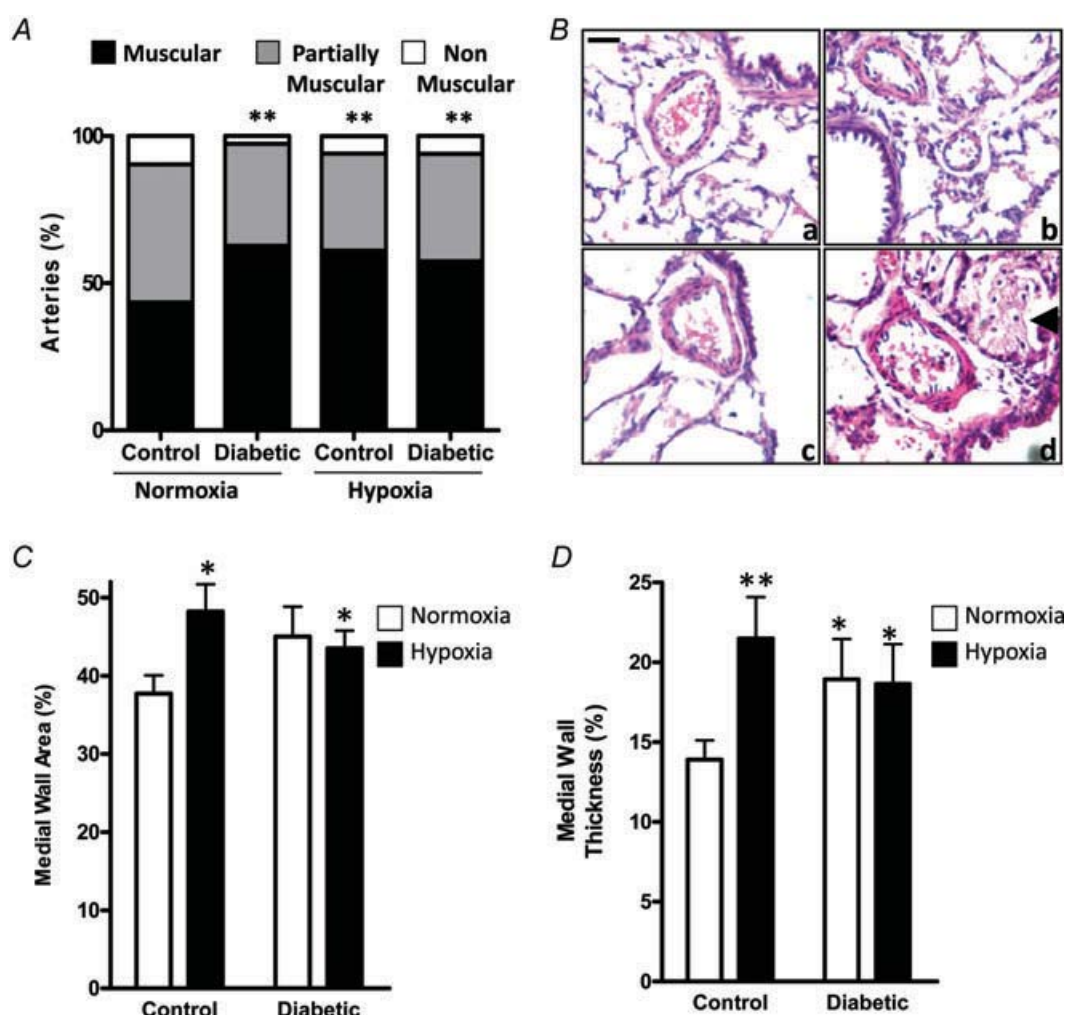
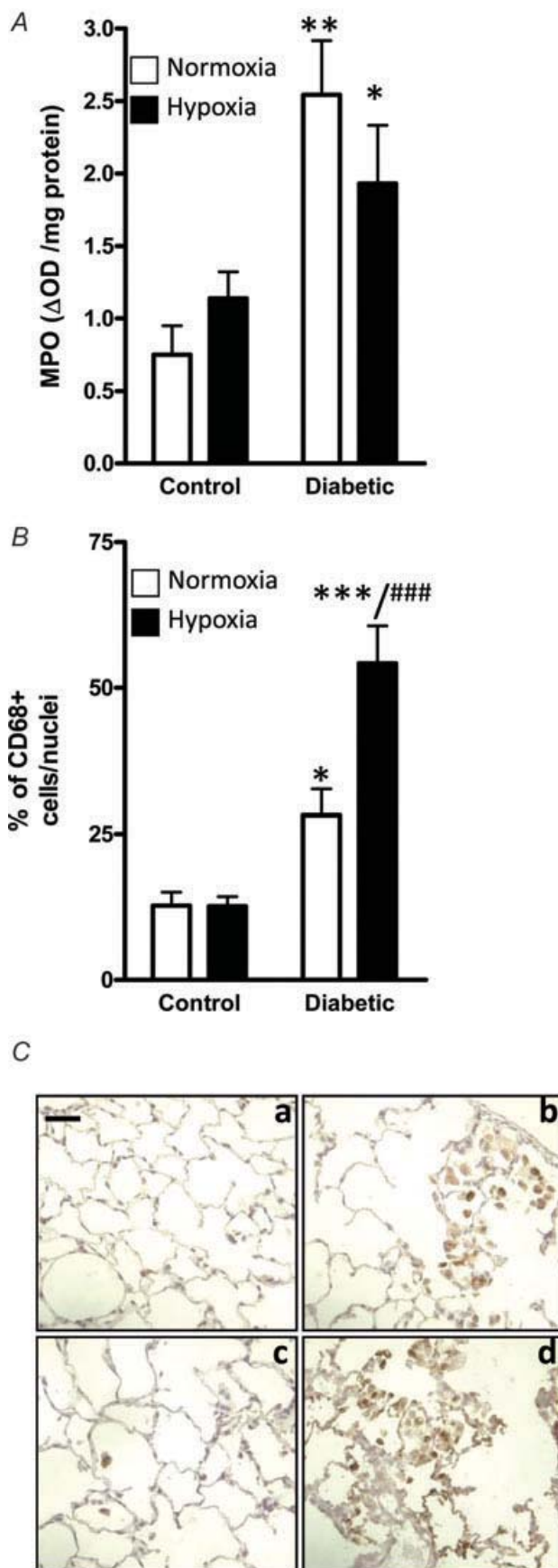


Figure 4. Remodelling of pulmonary arteries in diabetic and moderately hypoxic rats

A, percentage of muscular, partly muscular and non-muscular arteries in control and diabetic WKY rats exposed to normoxia or moderate hypoxia. Between 150 and 200 arteries were analysed from at least five animals in each group. B, representative photomicrographs ($\times 400$, scale bar, 50 μm) of cross-sections of lungs (stained with Haematoxylin and Eosin) showing muscular arteries from control (a), diabetic (b), hypoxic (c) and diabetic plus hypoxic WKY rats (d). Inflammatory infiltrate in Bd is indicated by an arrowhead. Percentage medial wall area (C) and percentage medial wall thickness (D) of small pulmonary arteries (25–75 μm external diameter). Each bar shows the mean \pm SEM ($n = 18$ –25 arteries from three or four animals in each group); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus normoxic control.



in association with other risk factor(s), such as diabetes.

As previously described (Lopez-Lopez *et al.* 2008, 2011), diabetes, but not moderate hypoxia, induced PA endothelial dysfunction. Diabetic pulmonary endothelial dysfunction seems to be associated with increased superoxide production and upregulation of the NADPH oxidase subunit p47^{phox} (Lopez-Lopez *et al.* 2008). Moreover, moderate hypoxia did not lead to further worsening of endothelial function. The lack of effect of moderate hypoxia on endothelial function contrasts with the effect of more severe hypoxia, which is associated with decreased endothelium-dependent relaxation involving vascular production of superoxide (Mam *et al.* 2009). In an increasing number of studies, recruitment of non-resident inflammatory cells has been detected in patients with PH and in animal models of disease (Frid *et al.* 2006; Perros *et al.* 2007; Sanchez *et al.* 2007; Li *et al.* 2011; Vergadi *et al.* 2011) and has been suggested as a potential mechanism underlying the development of PH. Among the inflammatory cells implicated in PH, those of the monocyte/macrophage lineage have been correlated with disease more often. Accordingly, diabetes but not moderate hypoxia, resulted in lung inflammation that consisted predominantly of CD68-positive macrophages, which were markedly increased when both diabetes and moderate hypoxia were combined. Concerning endothelial dysfunction, the lack of effect of moderate hypoxia on macrophage recruitment contrasts with the effect of more severe hypoxia, which is associated with a robust recruitment of circulating inflammatory cells in the lung (Frid *et al.* 2006; Vergadi *et al.* 2011). However, our findings correlate with previous studies suggesting that accumulation of lung macrophages precedes the development of PH (Lopez-Lopez *et al.* 2011; Vergadi *et al.* 2011) and appears to play a critical role in the pathogenesis of the disease. Recently, BMPR2 has been shown to maintain the barrier function of the pulmonary artery endothelial monolayer, suppressing leucocyte transmigration (Burton *et al.* 2011). Thus, reduced BMPR2 expression may favour the increased inflammation in diabetic lungs. However, this effect was

Figure 5. Moderate hypoxia potentiates the infiltration of macrophages in the lungs induced by diabetes

A, myeloperoxidase (MPO) activity (means + SEM) in lung homogenates from four animals. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus normoxic control. Percentage of CD68-positive cells (B) and representative photomicrographs (×400, scale bar, 50 μm) of CD68 staining from cross-sections of lungs counterstained by Haematoxylin (C) from control (a), diabetic (b), hypoxic (c) and diabetic plus hypoxic WKY rats (d). Each bar shows the mean + SEM (*n* = 6–9 random sections analysed per animal, from three or four animals in each group); **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 versus normoxic control; ###*P* < 0.001 versus normoxic diabetic.

not observed in moderately hypoxic animals despite nearly similar effects on BMPR2, indicating that additional factors were required.

A recent study has correlated small increases in PA pressure with a negative impact on survival in the

general population (hazard ratio, 2.73 per 10 mmHg), independently of other known systemic risk factors (Lam *et al.* 2009), opening a new exciting field of research. Thus, we speculate that increased PA pressure might contribute to the increased cardiovascular events and

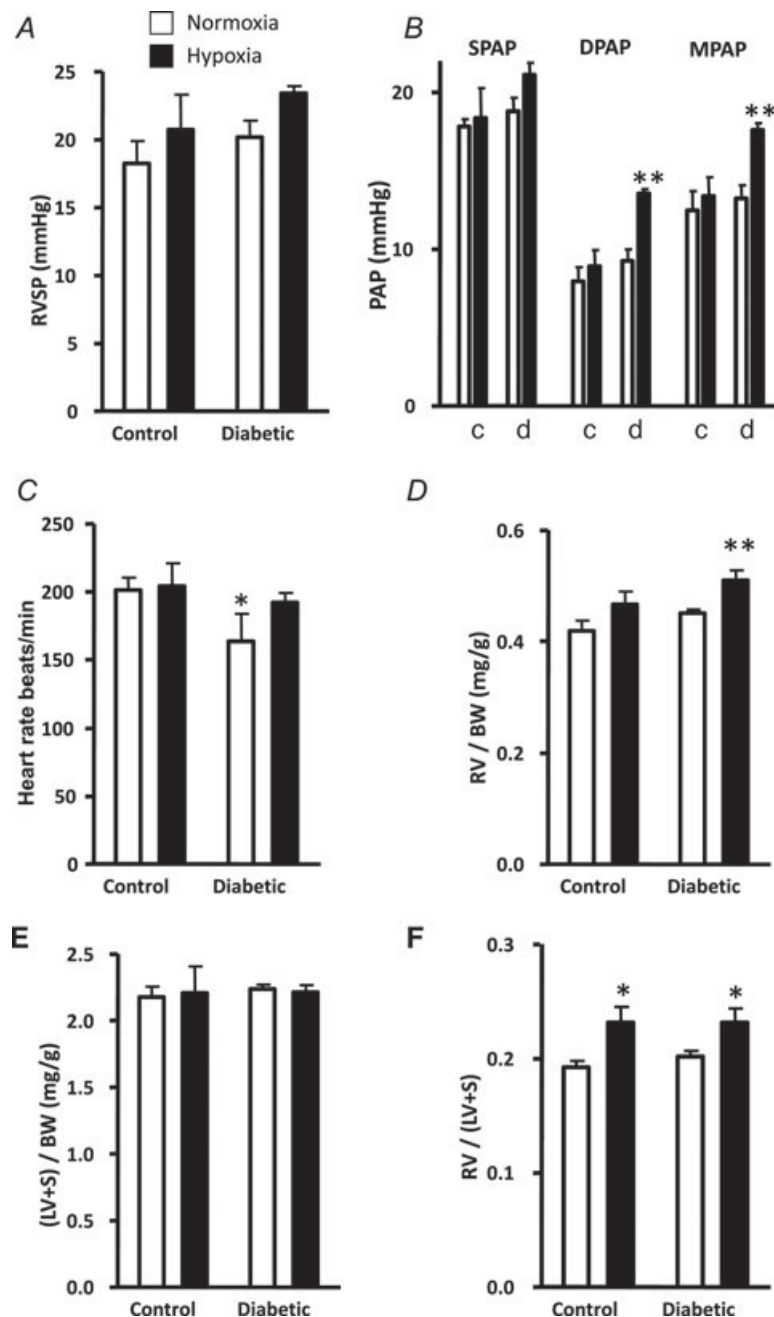


Figure 6. Diabetes plus moderate hypoxia increase pulmonary artery pressure (PAP) and induce right ventricular hypertrophy in WKY rats

A, right ventricular systolic pressure (RVSP). B, systolic, diastolic and mean pulmonary artery pressure (SPAP, DPAP and MPAP). C, heart rate. D, right ventricular weight relative to body weight (RV/BW). E, left ventricle + septum weight relative to body weight [(LV + S)/BW]. F, Fulton index [RV/(LV + S) ratio]. Each column represents the mean \pm SEM in control (c) or diabetic rats (d) in normoxic (open columns; $n = 7$ and 5 , respectively) and moderately hypoxic conditions (filled columns; $n = 6$ and 5 , respectively); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus normoxic control.

decreased survival in patients with diabetes (either type 1 or type 2). Moreover, we hypothesized that diabetes may be an accelerating factor for development of PH. Therefore, we intentionally chose a mild level of hypoxia (14% O₂, partial pressure of O₂ equivalent to 3700 m of altitude), which *per se* has modest effects on pulmonary haemodynamics. We anticipated that diabetes might increase the 'hypoxia sensitivity', as in other models of PH such as the fawn-hooded rat (Sato *et al.* 1992). In fact, reduced eNOS activity, as occurs in our diabetic model, is associated with increased hypertensive response to mild hypoxia in *eNOS*^{+/-} and *eNOS*^{-/-} mice (Fagan *et al.* 1999). As expected, the effects of diabetes and moderate hypoxia were synergistic on PA pressures. In addition, the synergistic effect of diabetes and moderate hypoxia on the recruitment of macrophages suggests a critical role for these inflammatory cells in the development of PH. However, the effects of moderate hypoxia plus diabetes on other parameters were additive, and diabetes was unable to induce further alterations in hypoxic rats on other markers of PH (e.g. medial wall thickness). Likewise, the increased susceptibility of *Bmpr2*^{+/-} mice to hypoxic PH was not accompanied by an increase in pulmonary vascular remodelling, but was associated with defective endothelium-dependent vasodilatation (Frank *et al.* 2008). However, our data suggest that the PA endothelial dysfunction induced by diabetes is not further worsened by moderate hypoxia. The possibility that LV dysfunction contributes to the increased elevated pulmonary arterial pressure in diabetic rats cannot be ruled out. However, the changes in the pattern of lung protein expression and the greater hypertrophy of the right ventricle compared with the left ventricle suggest that elevated pressure is not originated primarily in the left heart.

Conclusions

Type 1 diabetes mellitus induced pulmonary vascular abnormalities as part of a systemic vascular disease. These changes were characteristic of PH, such as endothelial dysfunction, downregulation of BMPR2, inflammatory infiltrate and pulmonary vascular remodelling. The haemodynamic and histological changes of diabetes were mild, comparable to those of moderate hypoxia, and the elevated PA pressure and RV hypertrophy only developed in the presence of diabetes combined with moderate hypoxia. Therefore, our results further strengthen the link between diabetes and pulmonary vascular disease. These findings are consistent with a multifactorial pathogenesis, where a single factor (i.e. BMPR2 downregulation, K_v inhibition or endothelial dysfunction) is insufficient to cause PH *per se*, but may predispose to development of PH in association with another risk factor.

References

- Al-Shafei AI, Wise RG, Gresham GA, Bronns G, Carpenter TA, Hall LD & Huang CL (2002). Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *J Physiol* **538**, 541–553.
- Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC & Morrell NW (2002). Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* **105**, 1672–1678.
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK & Archer SL (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**, 2630–2641.
- Burton VJ, Ciucan LI, Holmes AM, Rodman DM, Walker C & Budd DC (2011). Bone morphogenetic protein receptor II regulates pulmonary artery endothelial cell barrier function. *Blood* **117**, 333–341.
- Chan SY & Loscalzo J (2008). Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 14–30.
- Coggins MP & Bloch KD (2007). Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1877–1885.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeño L, Tamargo J & Perez-Vizcaino F (2006). Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* **98**, 931–938.
- Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG Jr, Hepler LK, Sato K, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, McMurtry IF & Rodman DM (1999). The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest* **103**, 291–299.
- Fouty B (2008). Diabetes and the pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L725–L726.
- Frank DB, Lowery J, Anderson L, Brink M, Reese J & de Caestecker M (2008). Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in *Bmpr2* mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L98–L109.
- Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N & Stenmark KR (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* **168**, 659–669.
- Guignabert C, Izikki M, Tu LI, Li Z, Zadigue P, Barlier-Mur AM, Hanoun N, Rodman D, Hamon M, Adnot S & Eddahibi S (2006). Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res* **98**, 1323–1330.

- Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ & Rabinovitch M (2007). Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Circulation* **115**, 1275–1284.
- Hernández-Díaz S, Van Marter LJ, Werler MM, Louik C & Mitchell AA (2007). Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* **120**, e272–e282.
- Hong Z, Weir EK, Nelson DP & Olschewski A (2004). Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 337–343.
- The International PPH Consortium, Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC & Trembath RC (2000). Heterozygous germline mutations in *BMPR2*, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* **26**, 81–84.
- Lam CS, Borlaug BA, Kane GC, Enders FT, Rodeheffer RJ & Redfield MM (2009). Age-associated increases in pulmonary artery systolic pressure in the general population. *Circulation* **119**, 2663–2670.
- Li M, Riddle SR, Frid MG, El Kasmi KC, McKinsey TA, Sokol RJ, Strassheim D, Meyrick B, Yeager ME, Flockton AR, McKeon BA, Lemon DD, Horn TR, Anwar A, Barajas C & Stenmark KR (2011). Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol* **187**, 2711–2722.
- Long L, MacLean MR, Jeffery TK, Morecroft I, Yang X, Rudarakanchana N, Southwood M, James V, Trembath RC & Morrell NW (2006). Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in *BMPR2*-deficient mice. *Circ Res* **98**, 818–827.
- Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A & Perez-Vizcaino F (2008). Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L727–L732.
- Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Moreno L, Menendez C, Flores-Hernandez J, Lorente JA, Cogolludo A & Perez-Vizcaino F (2011). Type 1 diabetes-induced hyper-responsiveness to 5-hydroxytryptamine in rat pulmonary arteries via oxidative stress and induction of cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* **338**, 400–407.
- Makarevich AE, Valevich VE & Pochtavtsev AU (2007). Evaluation of pulmonary hypertension in COPD patients with diabetes. *Adv Med Sci* **52**, 265–272.
- Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou HA & Khalil RA (2009). Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **332**, 455–462.
- Meyrick B, Hislop A & Reid L (1978). Pulmonary arteries of the normal rat: the thick walled oblique muscle segment. *J Anat* **125**, 209–221.
- Moral-Sanz J, Menendez C, Moreno L, Moreno E, Cogolludo A & Perez-Vizcaino F (2011). Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats. *Respir Res* **12**, 51.
- Moreno L, Losada B, Cogolludo A, Lodi F, Lugnier C, Villamor E, Moro M, Tamargo J & Perez-Vizcaino F (2004). Postnatal maturation of phosphodiesterase 5 (PDE5) in piglet pulmonary arteries: activity, expression, effects of PDE5 inhibitors, and role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Pediatr Res* **56**, 563–570.
- Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, Hecker M, Zakrzewicz A, Kouri FM, Peters DM, Dumitrascu R, Seeger W, Knaus P, Schermuly RT & Eickelberg O (2007). Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1072–1078.
- Movahed MR, Hashemzadeh M & Jamal MM (2005). The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type II diabetes mellitus. *Chest* **128**, 3568–3571.
- Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, Herve P, Simonneau G, Emilie D & Humbert M (2007). Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **29**, 937–943.
- Rabinovitch M (2008). Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* **118**, 2372–2379.
- Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB Sr & Wilson PW (2005). Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes* **54**, 3252–3257.
- Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, Adnot S & Eddahibi S (2007). Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 1041–1047.
- Sato K, Webb S, Tucker A, Rabinovitch M, O'Brien RF, McMurtry IF & Stelzner TJ (1992). Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am Rev Respir Dis* **145**, 793–797.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N & Souza R (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S43–S54.
- Song Y, Jones JE, Beppu H, Keaney JF Jr, Loscalzo J & Zhang YY (2005). Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous *BMPR2*-mutant mice. *Circulation* **112**, 553–562.
- Takahashi H, Goto N, Kojima Y, Tsuda Y, Morio Y, Muramatsu M & Fukuchi Y (2006). Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L450–L458.
- Tuominen VJ, Ruotoistenmaki S, Viitanen A, Jumppanen M & Isola J (2010). ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res* **12**, R56.
- van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP & Schols AM (2010). Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. *Chest* **138**, 393–406.

- Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, Mitsialis SA & Kourembanas S (2011). Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **123**, 1986–1995.
- Wang SN, Lapage J & Hirschberg R (2001). Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **12**, 2392–2399.
- Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB & Rubin LJ (1998). Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* **98**, 1400–1406.

Zamanian RT, Hansmann G, Snook S, Lilienfeld D, Rappaport KM, Reaven GM, Rabinovitch M & Doyle RL (2009). Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **33**, 318–324.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (grants SAF2008-03948 and AGL2007-66108 to F.P.-V; SAF2010-22066-C02-02 to A.C.; Juan de la Cierva contract to L.M.; and predoctoral FPI grant to C.M.), Ministerio de Educación (predoctoral FPU grant to J.M.-S. and L.E.) and a Marie Curie European Reintegration Grant within the 7th European Community Framework Programme (AOR-PERG05-GA-2009-249165 to F.P.V. and L.M.).